

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SÉPARATION DES OLIGOMÈRES DU CHITOSANE PAR
CHROMATOGRAPHIE D’AFFINITÉ SUR IONS MÉTALLIQUES
IMMOBILISÉS

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
FRANTZ LE DEVEDEC

JANVIER 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le professeur Mircea Alexandru Mateescu, mon directeur de recherche, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et pour les bourses accordées durant mes études en maîtrise.

Je tiens à remercier tous mes collègues du laboratoire notamment Francine Hamel pour son aide précieuse, ainsi que Laurent Bazinet, Isabelle Boucher, Sylvain Canesi et Mircea Alexandru Mateescu qui ont investi leur temps à l'évaluation de ce mémoire.

Je tiens à remercier particulièrement mes parents qui sont loin de moi et qui m'ont appuyé durant les moments difficiles de ma maîtrise.

J'adresse mes remerciements à la société ISM Biopolymer inc. pour l'intérêt au projet et pour l'appui financier accordé au projet par la subvention accordée dans le cadre du programme d'action concertée du Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) ayant permis l'avancement de cette recherche.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET SCHÉMAS	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
RÉSUMÉ	x
 PARTIE I INTRODUCTION	 1
Avant-propos.....	2
 CHAPITRE I	
Le chitosane et ses oligomères.....	5
1.1. La Chitine et le chitosane.....	5
1.1.1. Origine des polymères	5
1.1.2. Techniques de transformation de la chitine en chitosane.....	7
1.1.3. Le chitosane	9
1.1.3.1. Structures et caractérisation du chitosane	10
- La solubilité du chitosane	10
- Caractérisation du chitosane	11
1.1.3.2. Propriétés complexantes.....	13
- Complexes avec les ions métalliques.....	13
- Complexes électrostatiques.....	15
1.1.3.3. Dérivés du chitosane	17
1.1.3.4. Applications du chitosane et de ses dérivés	20
- Domaine médical et pharmaceutique.....	20
- Domaine industriel et environnemental	21
1.2. Oligomères de chitosane : chitooligosaccharides (COS).....	24

1.2. Oligomères de chitosane : chitooligosaccharides (COS)	24
1.2.1. Obtention des COS.....	24
1.2.1.1 Méthodes enzymatiques	25
- Réacteurs de type « Batch ».....	26
- Réacteurs type colonne avec enzymes immobilisées	28
- Réacteurs avec membrane d'ultrafiltration.....	28
1.2.1.2 Méthodes physico-chimiques.....	29
1.2.2. Propriétés chélatantes des COS.....	32
1.2.3. Activités biologiques.....	34
1.2.3.1. Activités antimicrobiennes.....	35
1.2.3.2. Activités au niveau cellulaire	36
CHAPITRE II	
Concept de séparation des COS en chromatographie d'affinité par immobilisation d'ions métalliques divalents	41
2.1. Généralités sur la chromatographie.....	41
2.1.1. Généralités.....	41
2.1.2. Caractéristiques et paramètres d'un système chromatographique....	45
2.2. <i>Immobilized metal affinity chromatography</i> (IMAC)	48
2.2.1. Historique.....	48
2.2.2. Principe du système IMAC	50
2.2.3. Spécificités de IMAC	51
- Les supports IMAC.....	51
- Activation des supports.....	52
- Fonctionnalisation du type IMAC	54
- Bases de développement d'un protocole IMAC	57
- Régénération du système	57
2.3 Applications du système IMAC	58

CHAPITRE III

Projet de maîtrise.....	60
-------------------------	----

PARTIE II EXPÉRIMENTALE	63
-------------------------------	----

CHAPITRE IV

Article : Séparation d'un mélange d'oligomères de chitosane par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés	63
--	----

<i>Manuscript: "Separation of chitosan oligomers by immobilized metal affinity chromatography"</i>	65
--	----

CHAPITRE V : Discussion, conclusions et perspectives	97
--	----

Annexes.....	100
--------------	-----

Bibliographie.....	104
--------------------	-----

LISTE DES FIGURES ET SCHÉMAS

PARTIE INTRODUCTION

Figure		Page
1.1	Structure de la chitine.....	6
1.2	Structure chimique du chitosane	7
1.3	Procédure générale pour l'obtention de la chitine et du chitosane	9
1.4	Structures proposées du complexe entre cuivre (II) / Chitosane (adapté de <i>Rhazi et al., (2002)</i>	15
1.5	Fonctionnalisations possibles des polysaccharides par réaction sur les groupements amino $-NH_2$ (ou hydroxyliques) (adapté de la thèse <i>Canh Le Tien, 2001</i>	19
1.6	Schéma typique du procédé enzymatique dans un réacteur « batch » adapté de <i>Kim & Rajapakse (2005)</i>	27
1.7	Schéma représentant un système en continu formé de deux réacteurs enzymatiques (colonne + batch) et d'une membrane d'ultrafiltration (adapté de <i>Jeon et Kim, 2000</i>)	29
1.8	Mécanismes types de la dépolymérisation du chitosane radicalaire et acide (adapté de <i>Barreteau et al., 2006</i>)	31
1.9	Mécanisme général de la glycosilation par voie chimique et enzymatique	32
1.10	Coordinations possibles entre les dimères et le cuivre (II)	34
2.1	Chromatogramme typique.....	46
2.2	Comparaison de la résolution de différentes séparations.....	47
2.3	Présentation schématique des groupements chélateurs communément utilisés complexés avec différents métaux de transition.....	52
2.4	Voies d'activation possibles de supports chromatographiques.....	54

Schéma 3.1	Organigramme des différentes étapes du projet de maîtrise	61
------------	---	----

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Scheme 1 :	Hypothetical structures of some chelators complexed with usually used metal ions.....	89
------------	---	----

Figure		Page
1	FT IR profiles of agarose and silica derivatives.....	90
3	Relative retention capacity of COS on 10 mL of various chelating gels bed (ACL6B-IDA, ACL6B-CM-ASP and ACL6B-TED).	91
4	Relative retention capacity of COS on silica (Silica-IDA 9.5-11 μm Davisil®, and 5-25 μm TLC silica).	92
5	HPLC-MS-Q analysis of ISM COS mixture (II, III, IV)	93
6	Chromatographic profile of COS on ACL6B-CM-Asp column	94
7	Elution profile of relative population (area) of COS on ACL6B-CM-Asp column (12 cm^3) under imidazol gradient (2-4 mM)	95

LISTES DES TABLEAUX

PARTIE INTRODUCTION

Tableau 1 :	Principales applications du chitosane (adapté de <i>Rinaudo, 2006</i>).	23
Tableau 2 :	Effets des COS du chitosane sur la croissance de différents types de tumeurs murines	39
Tableau 2.1 :	Caractéristiques de phases stationnaires <i>IMAC</i> retrouvées commercialement (<i>Sources : manufacturiers</i>)	56
Tableau 2.2 :	Applications du principe IMAC dans différents domaines d'intérêts.....	59

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Table 1	Capacity of retention of Cu^{2+} onto different IMAC chelating matrices (ACL6B-IDA,-CM-Asp,-TED and silica-IDA)	96
Table 2	COS purity and yields of pooled fractions obtained by MS analysis at different oligomers loading	96

LISTES DES ABRÉVIATIONS

AAS	Spectrophotométrie d'Adsorption Atomique
ACL6B-CM-Asp	Bille d'Agarose CarboxyMéthyl-Aspartate
ACL6B-IDA	Bille d'Agarose Iminodiacétate
ACL6B-TED	Bille d'Agarose Tris(carboxyméthyl)EthyleneDiamine
AcNa	Acétate de Sodium
BCA	Acide bicinchoninique
BET	Calcul de la surface spécifique (Brunauer, Emmett, Teller)
CAC	Concentration d'Agrégation Critique
CD	Dichroïsme Circulaire
CMC	Concentration Micellaire Critique
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
COS	ChitoOligoSaccharide
DA	Degré d'Acétylation
DD	Degré de Déacétylation
DP	Degré de Polymérisation
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FTIR	Spectroscopie Infra-Rouge à Transformer de Fourier
GLYMO	3-glycidoxypropylmethoxysilane
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MOP	3-Morpholinopropanesulfonic acid
PEC	Polyélectrolytes de charges opposées
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
SEM	Microscopie Électronique à Balayage
Silica-IDA	Silice modifiée avec groupements iminodiacétates
TEM	Microscopie Électronique à Transmission

RÉSUMÉ

Depuis les années 1990, les oligomères du chitosane (COS) suscitent un intérêt croissant pour certaines applications biomédicales et alimentaires. Il est possible d'obtenir différents ratios d'oligomères à des degrés de polymérisation (DP) variant de 2 à 8 unités, selon le procédé d'hydrolyse du chitosane employé (chimique ou enzymatique). Il est difficile d'étudier leurs effets tant physiques que biochimiques de façon individuelle car ces oligomères sont difficiles à séparer et jusqu'à maintenant, leur commercialisation est limitée. Tout comme le chitosane, les oligomères possèdent des propriétés de complexation avec des ions métalliques de transition. Plusieurs facteurs interviennent lors de la formation de complexes avec le chitosane, notamment le pH, le degré de polymérisation (DP) ainsi que l'ion métallique. Le travail élaboré dans ce mémoire s'est basé sur l'hypothèse d'une séparation possible d'un mélange de COS (dimère, trimère, tétramère) en faisant intervenir l'affinité avec des ions métalliques en fonction du DP.

Nous proposons ainsi une méthode chromatographique basée sur l'affinité entre les ions métalliques cuivre (II) et les groupements amine des oligomères de chitosane. La chromatographie d'affinité sur des ions métalliques immobilisés (IMAC) est déjà appliquée à la purification de biomacromolécules (protéines, ADN). L'adaptation de ce type chromatographique à notre problématique montre un réel intérêt car le développement du système est économique et simple d'utilisation. Des matériaux polyhydroxyliques (Agarose et silice) ont été fonctionnalisés par des groupements de type IMAC. Différentes fonctions chélatantes ont été greffés sur la Sepharose CL-6B (agarose réticulée): l'acide iminodiacétique (IDA), l'acide aspartique carboxyméthylé (CM-Asp) et le tris(carboxyméthyl)diamine (TED). Ces matrices ont été caractérisées par FTIR et leurs capacités de rétention de Cu^{2+} par spectrophotométrie d'adsorption atomique (AAS). Un mélange commercial de COS (dimère, trimère, tétramère) fourni par ISM Biopolymer inc, a été utilisé pour l'étude sur les capacités de rétention. Les différents supports IMAC à base d'agarose (ACL6B) ont montré des quantités de rétention en COS respectivement de 6 mg/cm³, 4 mg/cm³ et 2 mg/cm³ sur les matrices modifiées (ACL6B-IDA, ACL6B-CM-Asp, ACL6B-TED). Les matériaux chromatographiques IMAC ont été employés en mode FPLC (à pression moyenne). Les fractions obtenues ont été analysées par une technique colorimétrique à base d'acide bicinconinique (BCA) et par chromatographie en couche mince avec la détection des oligomères à la ninhydrine. Les résultats sont corrélés avec l'analyse de la population retrouvée des différentes fractions par spectrométrie de masse quadripôle simple.

Les oligomères de chitosane ont été partiellement séparés et/ou enrichis (selon la méthode employée) à 95 % pour le dimère, 70 % pour le trimère et 90 % pour le tétramère, avec nos matériaux chélatants obtenus au laboratoire, à base d'agarose réticulée. Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec des matériaux chromatographiques commerciaux (Profinity, Chelex-100). Cette nouvelle méthode originale, à base de chromatographie d'affinité IMAC, offre des possibilités de diversification d'applications des COS et pourrait permettre de diminuer les coûts de revient lors de leur préparation à l'échelle industrielle.

Mots-clés : Chitosane, chitoooligosaccharide (COS), chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC).

PARTIE I
INTRODUCTION

Avant-propos

Depuis les années 1970, le chitosane suscite un grand intérêt au niveau pharmaceutique, biomédical, agricole et environnemental. Les travaux effectués sur le chitosane et ses dérivés ont montré la polyvalence et la pluridisciplinarité de ce polymère. Étant biodégradable et biocompatible, le chitosane montre un fort potentiel comme matériel bioactif, qui est toutefois limité par ses caractéristiques physico-chimiques. L'utilisation de chitosane de faible poids moléculaire (inférieur à 150 kDa) ou sous forme d'oligomères de chitosane (COS) montre un fort potentiel d'utilisation dans les milieux biologiques. Leur faible viscosité et leur bonne solubilité à pH neutre leur confèrent des propriétés recherchées dans différents domaines de recherche telles la nutrition et la santé.

Les récentes avancées dans le domaine ont permis de mettre en évidence les bienfaits de ces oligosaccharides sur l'organisme. Les travaux effectués sur les COS ont démontré une amélioration de la qualité de la nourriture et de la santé des individus testés. Ils ont démontré un grand nombre de propriétés biologiques et physiologiques variant selon le degré de polymérisation (DP) des oligomères. Diminution du taux de cholestérol sanguin, effets protecteurs contre les infections microbiennes et inhibition de la croissance de certaines tumeurs pour n'en nommer que quelques-uns.

Les COS sont obtenus principalement par des méthodes chimiques ou enzymatiques de dépolymérisation du chitosane par hydrolyse des liens osidiques. La stratégie la plus judicieuse permettant l'obtention de COS spécifiques est l'utilisation d'enzymes possédant une activité chitosanolytique telle que la chitosanase, la papaïne ou encore la pronase permettant l'obtention de mélanges d'oligomères de très faibles DP compris entre une et dix unités. Néanmoins il n'existe pas de techniques peu coûteuses permettant la séparation des COS à grande échelle. On retrouve principalement les systèmes membranaires d'ultrafiltration laissant passer une taille moléculaire spécifique de COS (ex. moins de 1000 Da) ou encore les systèmes

moléculaire spécifique de COS (ex. moins de 1000 Da) ou encore les systèmes chromatographiques de type gel d'exclusion moléculaire. Ces principales techniques permettent un pré-fractionnement de COS et non la séparation de chaque unité oligomérique (dimère, trimère, tétramère). Plusieurs techniques chromatographiques permettent la séparation de COS à l'échelle analytique. Leur application à grande échelle serait beaucoup trop coûteuse. On ne retrouve que quelques fournisseurs à travers le monde offrant une gamme de COS à des DP spécifiques mais leurs prix sont trop élevés pour valoriser et développer l'utilisation des COS pour différentes d'applications.

Ce travail vise l'élaboration d'un système séparatif à base de l'affinité stable, répétitif, reproductible et à des coûts de purification de COS intéressants. Ceci pour valoriser leur production ainsi que leur application en laboratoire (semi-préparatif) et/ou à l'échelle industrielle. Le concept développé sur la séparation de COS se base sur l'affinité existant entre les COS et le cuivre (II). Cette voie peut devenir une alternative dans la production de COS et s'adapter dans différentes étapes de la production. Les différentes phases stationnaires de type *IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography)* synthétisées lors de cette étude démontrent un fort potentiel pour la production industrielle de COS individuels à faible coût. Depuis peu, des études ont démontré les activités biologiques spécifiques de certains COS. Ainsi, la mise au point d'une nouvelle méthode préparative pourrait permettre la valorisation de ces produits biologiques ainsi que leurs effets bénéfiques. Pour améliorer la compréhension relative aux propriétés physico-chimiques et biologiques des COS, les principaux axes de cette recherche sont basés sur:

- La valorisation des déchets de la production marine (carcasses de crustacés) par le potentiel d'applications des COS dans l'industrie alimentaire et dans le domaine de la santé préventive et curative ;

- L'utilisation des propriétés chélatantes des COS par un concept de séparation chromatographique de type *IMAC* sur supports poly-hydroxyliques qui sont économiques et applicables à grande échelle;
- Le potentiel d'application du système séparatif des COS pour la production industrielle;
- La diminution du coût de production des COS afin de promouvoir leur utilisation au niveau biologique et alimentaire.

CHAPITRE I

Le chitosane et ses oligomères

1.1. La chitine et le chitosane

1.1.1. Origine des polymères

La chitine

La découverte de la chitine et du chitosane date de la fin du 19^{ème} siècle, mais ce n'est qu'à partir des années 1970 que ces polymères ont suscité un réel intérêt. Le terme chitine, d'origine grecque signifiant « *tunique* », par analogie avec la coquille des arthropodes et le vêtement. La chitine, une poly(*N*-acétyl-D-glucosamine, β -(1,4)-2-acétamido-2-désoxy-D-glucose), est l'un des constituants de la cuticule protectrice des insectes, des araignées et des crustacés (*Mathur et Narang, 1990*). Associée au carbonate de calcium, elle devient rigide et forme alors l'exosquelette des crustacés et de tous les animaux à coquille. Chez les champignons, la chitine est un constituant essentiel de la paroi latérale qui entoure et protège les cellules fongiques de l'environnement. Ainsi, les résidus de certains champignons issus de l'industrie permettent la production de chitine (*Yokoi et al., 1998; Nwe et Stevens, 2002*).

Le polymère de chitine est biosynthétisé par une enzyme appelée chitine synthétase (CHS) (EC 2.4.1.16). *Saccharomyces cerevisiae* possède plusieurs activités CHS permettant la production de chitine intracellulaire lors du bourgeonnement de ce champignon unicellulaire. La chitine est après la cellulose, le second polysaccharide le plus abondant dans la nature (*Rinaudo, 2006*). Selon *Jeuniaux et al., (1993)*, la production totale de chitine par les crustacés dans les écosystèmes marins à l'échelle de la planète serait de 2 milliards 300 millions de tonnes par an. Cette production serait imputable, pour près de 90%, aux organismes pélagiques, aux crustacés, au zooplancton et au krill. La contribution des autres

pélagiques, aux crustacés, au zooplancton et au krill. La contribution des autres organismes animaux producteurs de chitine apparaît négligeable par rapport à celle des crustacés. La valorisation des déchets issus de l'exploitation marine des crustacés est réalisée par l'extraction à l'échelle industrielle de la chitine par différents traitements effectués sur les coques de crevette et de crabe. En effet, on retrouve entre 15 et 35 % de chitine dans la carapace de diverses espèces de crevettes et de crabes (*Brine et al., 1992; Kobelke, 1990 et Muzzarelli et Peter, 1997*).

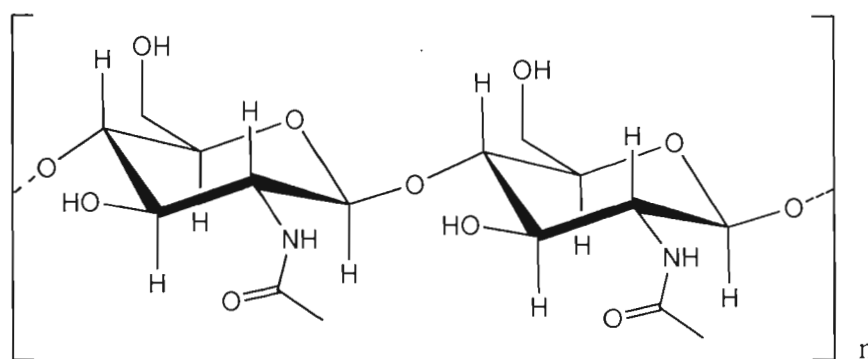


Figure 1.1: Structure de la chitine

Le chitosane

Le chitosane a été découvert en 1859 par C. Rouget en traitant la chitine avec du KOH concentré à température élevée. Mais ce n'est qu'en 1894 que Hoppe-Seyler a donné à la « chitine modifiée » le nom chitosane (*Okazaki et al., 2007*). Le chitosane, dérivé désacétylé de la chitine, est un polysaccharide non ramifié du type poly- β (1-4)-D-glucosamines partiellement acétylé (Fig. 1.2). Tandis que la chitine est produite largement par un grand nombre d'organismes vivants, la production de chitosane n'a été observée que chez quelques micro-organismes. On en retrouve dans la paroi d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes, et chez quelques insectes.

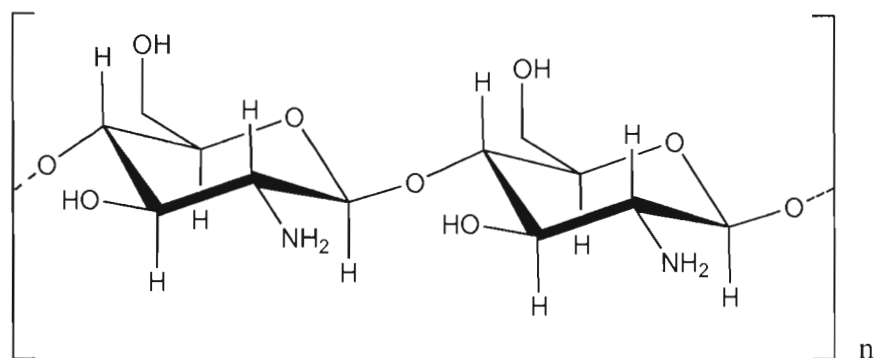


Figure 1.2 : Structure chimique du chitosane.

1.1.2. Techniques de transformation de la chitine en chitosane

Le chitosane ou poly(2-amine-2-deoxy-D-glucose) est obtenu par déacétylation alcaline de la chitine. Il est aujourd'hui produit commercialement à partir des déchets provenant de la consommation de crustacés et de la transformation industrielle de champignons (*Johnson et Peniston, 1982*). Le degré déacétylation (DD) des produits commerciaux varie de 60 à 100%. Les propriétés physico-chimiques du chitosane varient selon le DD et selon le degré de polymérisation (DP). Le chitosane est obtenu après une succession de traitements chimiques des carapaces de crustacés (Fig. 1.3). La déacétylation est une étape délicate dans laquelle les techniques font appel à des étapes d'hydrolyses basiques. Des conditions expérimentales trop agressives pour le polymère peuvent entraîner une forte dépolymérisation. Un procédé de déacétylation de la chitine en milieu basique concentré en présence de solvants miscibles à l'eau tels que le 2-propanol ou l'acétone a été proposé, réduisant la dépolymérisation du chitosane, rendant possible son utilisation à l'échelle industrielle (*Kobayashi et Uyama, 2003*).

D'autres alternatives ont été développées pour désacétyler la chitine par l'utilisation d'enzymes ou par traitements thermomécaniques. Il a été possible d'atteindre des DD par voies enzymatiques (chitosanase et trypsine) comparables aux traitements basiques, soit près de 75% en 28 heures (*Frehaut, 2002; Nwe et Stevens, 2002*). L'autoclavage permet la déacétylation par traitement de la chitine sous atmosphère d'azote, en condition basique, à une pression de 15 Psi et à une température de 121 °C. Des degrés de déacétylation de l'ordre de 90 %, ont été atteint dépendamment de la masse moléculaire (*No et al., 2000*). Ces techniques sont intéressantes mais ne permettent pas pour l'instant leur application au niveau industriel. En effet, l'utilisation d'enzymes en industrie n'est pas viable car elle représente des coûts et des quantités nécessaires trop élevés. De plus, les coûts en infrastructures pour autoclavage représentent un problème majeur dans l'utilisation de ce procédé à l'échelle industrielle.

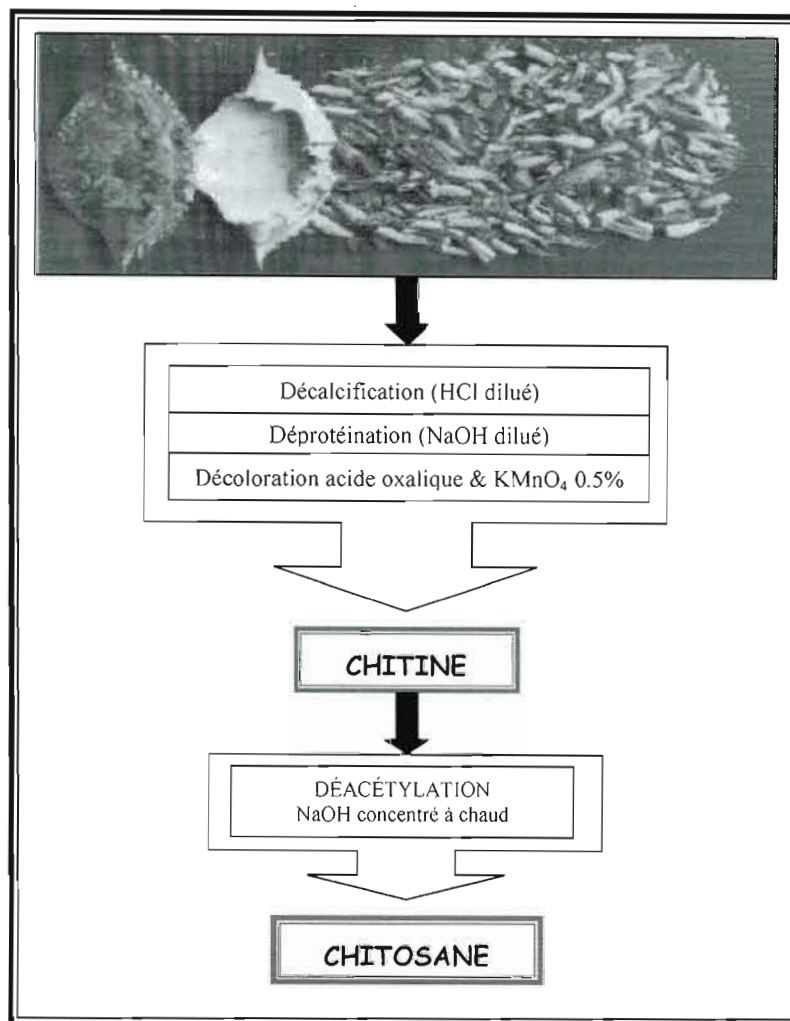


Figure 1.3 : Procédure générale pour l'obtention de la chitine et du chitosane.

1.1.3. Le chitosane

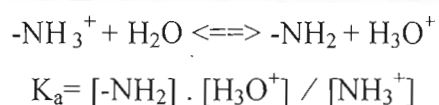
Le chitosane et la chitine sont de même structure chimique globale et se distinguent par le nombre d'unités désacétylées. Les propriétés physico-chimiques du chitosane varient selon le degré de désacétylation (DD) et selon le degré de polymérisation (DP). Ainsi, lorsque le DD est supérieur à 50%, le chitosane est appelé ainsi lorsqu'il devient soluble en milieu aqueux acidifié. Cette solubilité est

dépendante de la protonation de la fonction amine ($-\text{NH}_2$) sur la position C-2 de l'unité répétitive de glucosamine par la présence d'acide dilué (*Rinaudo et al., 1999*). Cette fonction lui confère de fortes propriétés biologiques mais le chitosane ne peut être utilisé que dans certaines conditions dépendantes du pH et de sa miscibilité.

1.1.3.1. Structures et caractérisations du chitosane

- La solubilité du chitosane

À l'état solide, le chitosane montre une structure irrégulière semi-cristalline; lorsque celui-ci est de faible poids moléculaire et 100% déacétylé, sa structure est cristalline. Le chitosane sous forme $-\text{NH}_2$ est insoluble dans l'eau, dans les acides concentrés, les bases et les solvants organiques. Ce sont ses propriétés acido-basiques qui permettent une dissolution facile. En effet, il est soluble dans les acides dilués grâce à la protonation de ses groupes amines suivant l'équilibre :



Comme pour tout polyélectrolyte, le pK_a du chitosane dépend plus particulièrement du degré de neutralisation des groupes NH_3^+ . Le pK_a va également dépendre du DA. En effet, la densité de charges varie d'un DA à l'autre pour un même degré de neutralisation de groupements NH_3^+ . Toutefois, quelle que soit la valeur du DA (comprise entre 0 et 25 %), pour des masses moléculaires suffisamment élevées, la valeur limite du pK_a obtenue à un degré de neutralisation égal à 1, est $\text{pK}_0 = 6,5$, pK_0 étant le pK_a intrinsèque du chitosane. La solubilité du chitosane varie donc

en fonction de la distribution et du pourcentage d'acétylation sur les chaînes. (Rinaudo *et al.*, 1999; Aiba, 1991; Domard, 1987).

- Caractérisation du chitosane

Le chitosane peut être caractérisé de façon simple par deux techniques rapides répandues ; l'analyse par spectroscopie infrarouge (FTIR) et par viscosimétrie. Pour connaître la viscosité, il existe différentes méthodes. La plus employée étant la viscosimétrie, il est nécessaire de connaître les paramètres **K** et **a** de la relation de *Mark-Houwink et Sakurada* :

$$[\eta] = K.M_v^a$$

Eq.1

Où : $[\eta]$: viscosité intrinsèque

M_v : Poids moléculaire moyen

a et K : constantes pour un système solvant/soluté donné

Selon le solvant employé, le pH, le DA, la température et la concentration de chitosane dissout, les constantes **K** et **a** ont différentes valeurs. Dans des conditions bien définies, il est possible de déterminer la masse moléculaire moyenne du chitosane par calcul de **M** absolu dans l'équation de *Mark-Houwink et Sakurada* (Roberts *et Domzy*, 1982; Kasaai, 2007). Ces méthodes présentent certains problèmes. En effet, la présence possible de microgels ou d'agrégats favorisés par les liaisons hydrogènes, des variations dans la force ionique, l'influence du vieillissement des solutions et des effets électrostatiques (dus aux charges des groupes amines protonés) induisent des erreurs de calculs.

L'analyse FTIR permet d'obtenir les empreintes spectrales vibrationnelles des groupements constituant une molécule. L'analyse se fait sur des échantillons solides (poudre) mais les résultats sont toutefois plus précis sous forme de films (*Balau et al., 2004; Cardenas et Miranda, 2004*). À titre d'exemple, le chitosane est préparé à 1% dans 1% d'acide acétique et la solution est déposée sur une surface plane en verre. Après séchage du film et lavage, la fine pellicule est caractérisée par FTIR.

Il est possible par cette méthode de déterminer le degré de déacétylation par la formule suivante (*Khan et al., 2002 ; Domzy et Roberts, 1985*) :

$$DD\% = 100 - \left[\left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115 \right]$$

Eq.2

Où A_{1655} = absorbance amide I^{aire}.

A_{3450} = absorbance du hydroxyle.

115 = Coefficient de correction de la ligne de base

Il existe d'autres techniques plus avancées et plus onéreuses pour caractériser le chitosane dont la RMN du proton (^1H) liquide, de l'azote (^{15}N) et du carbone (^{13}C). L'analyse des spectres obtenus par RMN permet de déterminer avec précision le DA et le degré de substitution (DS) du chitosane (*Heux et al., 2000*). Le degré d'acétylation se détermine, dans le cas de la RMN ^1H , par le ratio de l'aire des pics correspondant aux protons des unités *N*-acétylées (CH_3) et l'aire du proton en position 2 (H-2) du cycle glucosidique (*Raymond et al., 1993; Varum et al., 1991; Saito et al., 1987*).

Le calcul du DA en RMN du proton s'effectue à l'aide de l'équation suivante :

$$\overline{DA} = \left(\frac{A_{CH3}}{3A_{H-2}} \right) \times 100$$

Eq.3

Il est possible, de déterminer le pourcentage de groupements amines substitués lors de la fonctionnalisation du chitosane en utilisant l'équation 4 (*Moore et Roberts, 1980*). En tenant compte du DA du chitosane natif utilisé, le degré de substitution (DS) s'exprime à l' FTIR par l'équation suivante :

$$DS\% = \left[\left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) - DA \right] \times 100$$

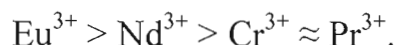
Eq.4

1.1.3.2 Propriétés complexantes

- Complexes avec les ions métalliques

Le chitosane est connu pour posséder de bonnes propriétés chélatantes; les groupements amines $-NH_2$ retrouvés sur les chaînes saccharidiques montrent de fortes interactions avec les ions métalliques. Un grand nombre de publications porte sur le potentiel lié aux interactions entre le chitosane et les métaux. La nature de l'ion métallique est importante car les mécanismes d'interactions varient.

Des études effectuées par *Rhazi et al.*, (2002) ont montré la différence d'affinité qui existe entre le chitosane (sous forme de films) et des cations divalents et trivalents :



Plusieurs facteurs affectent la formation de complexes avec le chitosane dont le pH et le degré de polymérisation (DP). La nature de l'ion et du contre-ion joue aussi un rôle important dans l'interaction entre les unités de glucosamine et le cation. La complexation dépend enfin de l'état physique du chitosane (film, fibre, gel, poudre ou solution) (*Rhazi et al.*, 2002; *Peniche-Covas et al.*, 1993; *Mitani et al.*, 1991).

D'après *Rhazi et al.*, (2002), le cuivre (II), cation montrant la plus grande affinité avec le chitosane, forme à pH>5 un complexe de type I et à pH<5.8, un complexe de type II (Fig. 1.4). Cette équipe a démontré, par des études potentiométriques et de dichroïsme circulaire (CD), la formation de complexes de type I lorsque le DP des COS est inférieur à 6 et de type II pour le chitosane (polymère). Les propriétés chélatantes du chitosane sont appliquées notamment pour le traitement des eaux usées ou encore pour le développement de phases stationnaires chromatographiques pour la séparation des protéines et des saccharides (*Carunchio et al.*, 1987; *Jinno et Takayarna*, 1989).

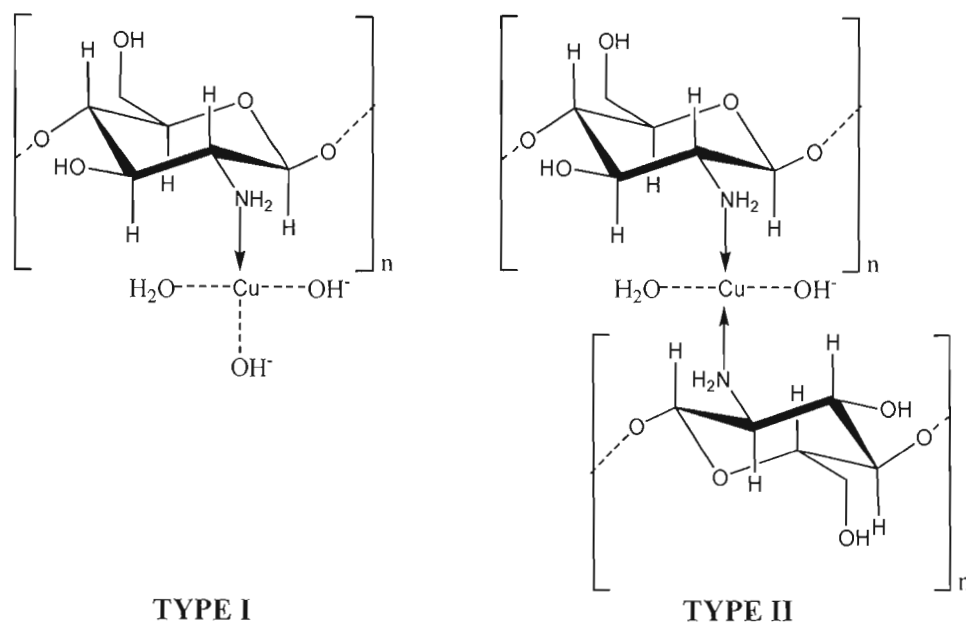


Figure 1.4 : Structures proposées du complexe entre cuivre (II) et le chitosane (adapté de Rhazi *et al.*, (2002))

- Complexes électrostatiques

Le chitosane a la capacité de former des complexes électrostatiques dans des conditions acides. On reconnaît deux différents types de complexes électrostatiques : La complexation avec des surfactants de charges opposées et la complexation avec des polyélectrolytes de charges opposées (PEC).

- *Interactions avec les surfactants :*

Le chitosane de faible DA forme avec le sodium dodécylsulfate (SDS) un système micellaire stable montrant une concentration d'agrégation critique (CAC) 100 fois plus petite que la concentration micellaire critique (CMC) du surfactant lui-même (Desbrière *et al.*, 1997; Babak *et al.*, 1999).

De plus, l'association entre une solution de chitosane et le SDS se caractérise par la formation de nanostructures ordonnées. Un système réticulé se crée entre une couche de gel chitosane et les charges portées par le surfactant. Cette structure pourrait permettre la stabilisation de macromolécules telles que des enzymes (*Babak et Merkovich, 2001*).

- *Interactions avec divers polyélectrolytes :*

Plusieurs complexes sont répertoriés dans la littérature entre le chitosane et certains polymères d'origine naturelle ou synthétique. Les études se basent sur la relation qui existe entre la « stabilité » du système polymérique et la nature des groupements ioniques entrant en jeu. On retrouve divers complexes électrostatiques formés avec l'acide polyacrylique, le xanthane, certains carragénanes, l'alginate, la pectine, l'héparine, l'acide hyaluronique ou encore la chondroïtine (*Vasiliu et al., 2005; Peniche et al., 2001; Goycoolea et al., 2000*). Selon les conditions expérimentales, la complexation avec l'alginate ou l'acide hyaluronique montre l'interaction entre les groupements carboxylates ($-\text{COO}^-$) et les fonctions amines protonées ($-\text{NH}_3^+$) du chitosane (*Arguelles-Monal et al., 2000*).

Lors de formulations thérapeutiques orales sous forme de billes ou des comprimés, le chitosane peut créer une couche protectrice hydratée à pH gastrique. Ceci permet la libération de substances thérapeutiques par contrôle de la dissolution de l'alginate à pH élevés (milieu intestinal), pH auxquels le chitosane devient insoluble. L'association peut se faire aussi à l'aide d'ions du type cationique, tel que le calcium (Ca^{2+}), permettant ainsi d'obtenir des complexes stables chitosane-alginate pH dépendants (*Huguet et al., 1994; Hari et al., 1996; Fwu-Long et al., 2002*). On retrouve un grand nombre de polyélectrolytes au niveau cellulaire notamment sur l'ADN. Plusieurs articles mentionnent les potentiels de complexation entre l'ADN et le chitosane, en particulier celui de faible masse moléculaire ou sous forme

d'oligomères (*Koping-Hoggard et al., 2001; Strand et al., 2005*). Les études ont montré qu'un degré de polymérisation supérieur à six unités permet d'obtenir des complexes stables par interaction ionique avec les phosphates (chargés négativement) retrouvés dans la structure l'ADN et les fonctions amines protonées des unités glucosamines, montrant, selon les conditions expérimentales, de bonnes activités de transfection (*Koping-Hoggard et al., 2004*).

1.1.3.3. Dérivés du chitosane

Il est possible d'agrandir le champ des applications du chitosane par divers types de modifications (fonctionnalisation et/ou réticulation). De façon générale, l'utilisation du chitosane est restreinte par ses propriétés mécaniques insuffisantes à l'état natif pour des applications plus larges dans divers domaines tels que pharmaceutique ou biomédical. On peut ainsi utiliser les propriétés biocompatibles du chitosane tout en le modifiant chimiquement et l'exploiter sous différentes formes tels que des comprimés, des hydrogels, des films, des billes ou encore sous forme de nanoparticules.

Différents types de modifications sont possibles dépendamment des propriétés désirées. On peut stabiliser un biomatériau par réticulation, réaction consistant à intercroiser les chaînes polymériques par l'intermédiaire de liens covalents ou ioniques. Ce processus permet notamment d'améliorer les résistances thermiques, mécaniques et liées à l'hydrolyse (acide, basique ou enzymatique) du polymère. De la réticulation résulte un réseau tridimensionnel plus ou moins dense, permettant un contrôle des facteurs modulant la libération contrôlée de substances actives et contribue à la stabilité physique et morphologique du support (culture cellulaire, libération thérapeutique, etc). Certains domaines d'applications nécessitent, à l'inverse, que le matériau utilisé possède des propriétés mécaniques suffisantes afin

de ne pas affecter la libération de substances thérapeutiques, de facteurs de croissance, d'hormones ou autres.

La réticulation peut être effectuée à l'aide d'agents chimiques tels que les dialdéhydes, l'épichlorhydrine, le sodium trimétaphosphate ou encore l'oxychlorure de phosphore. Tous ces agents réticulants sont réglementés et certains ne peuvent pas être utilisés dans le secteur pharmaceutique ou alimentaire. C'est le cas des phosgènes, de divers aldéhydes ou encore de l'éthylchloroformate qui ne sont pas autorisés par la FDA (Food and Drug Administration) et pour d'autres, de moins en moins utilisés dans l'industrie car ils montrent une forte toxicité. Le chitosane peut être réticulé avec lui-même ou avec d'autres polymères formant ainsi divers composites aux multiples propriétés. Le chitosane a été co-réticulé avec du polyamide 6, de la cellulose, de l'alcool polyvinylique ainsi qu'avec de l'alginate. Selon les conditions, ces biomatériaux ont montré de bonnes propriétés mécaniques et/ou biologiques (*Hosokawa et al., 1990; Mucha et al., 1991; Huguet et al., 1994; Ko et al., 1997*).

La fonctionnalisation des polymères consiste à introduire des fonctions déterminées par couplage covalent de certains composés chargés positivement ou négativement ou hydrophobiques (Fig. 1.5). Ces modifications amènent fréquemment à un changement conformationnel du polymère, offrant ainsi de nouvelles propriétés biologiques et physiques. Elles permettent notamment d'augmenter la solubilité et la miscibilité du chitosane permettant la stabilisation de divers systèmes. L'utilisation du chitosane *N*-acylé par différentes chaînes d'acides gras (C_6 - C_{16}) a montré un bon potentiel dans la formulation orale et subdermale à libération contrôlée de médicaments (*Le Tien et al., 2003*). Le carboxyméthyl chitosane (CM-chitosane) est l'un des dérivés anioniques les plus étudiés (*Rinaudo et al., 1992; Le Dung et al., 1994*). Selon la technique employée, il est possible d'obtenir sélectivement de la *N*-carboxyméthylation en présence d'acide glyoxylique et d'un agent réducteur.

D'autres dérivés anioniques sulfatés ont été développés en position 6-*O*-sulfate et plus récemment sélectivement *N*-sulfate (Naggi *et al.*, 1986; Holme *et Perlin*, 1997). À l'inverse, des dérivés polycationiques ont été développés par quaternisation du chitosane (triméthylammonium chitosane) utilisant l'iodure de méthyle en conditions basiques (Domard *et al.*, 1986).

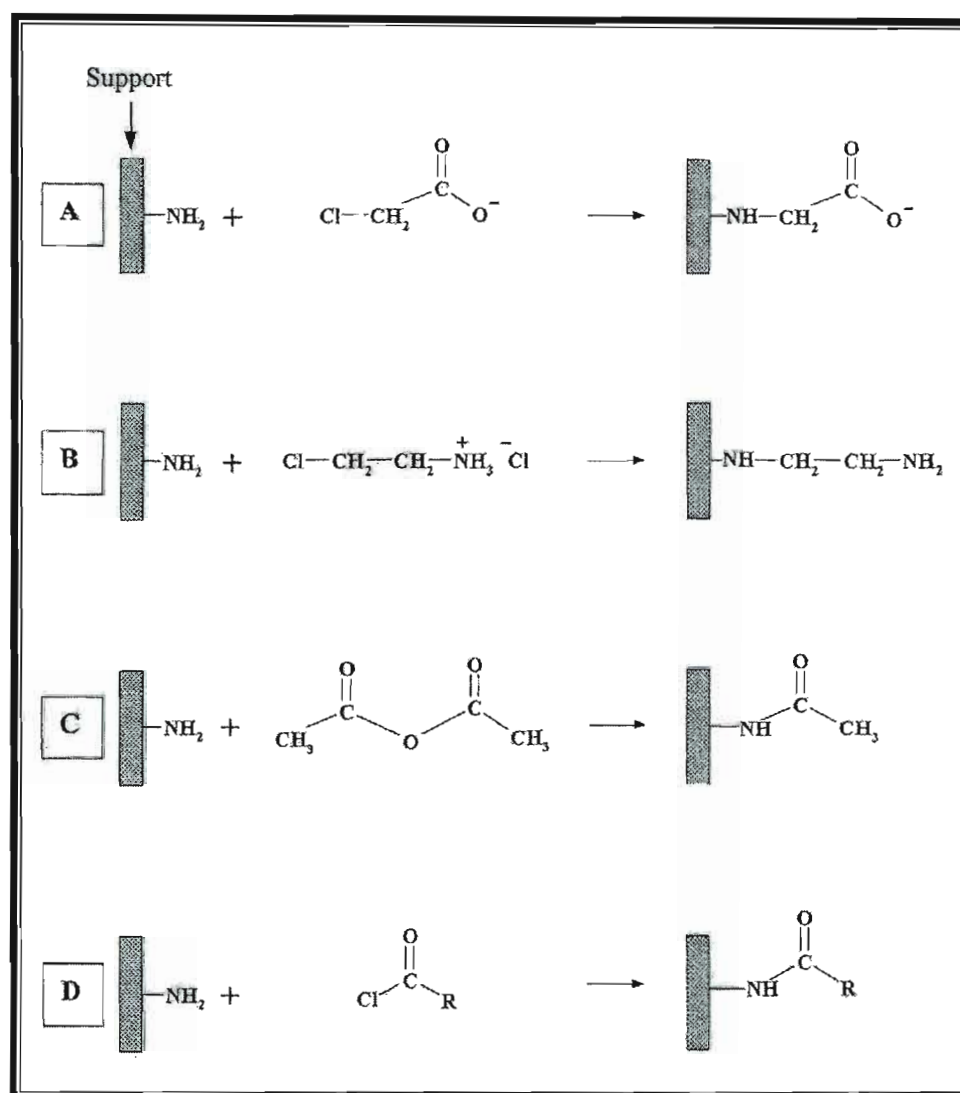


Figure 1.5 : Fonctionnalisations possibles des polysaccharides par réaction sur les groupements amino -NH₂ (ou hydroxyliques) (adapté de la thèse *Le Tien*, 2001). (A) l'acide monochloroacétique, (B) la chloroéthylamine, (C) l'anhydride acétique, (D) chlorure d'acyle.

1.1.3.4. Applications du chitosane et de ses dérivés

- Domaine médical et pharmaceutique

Dépendamment du secteur d'application, la libération d'agents bioactifs vise différentes voies d'administration. On retrouve généralement la voie orale, parentérale, transdermique, les systèmes d'implant et plus récemment l'administration transmucoale. À l'état natif, le chitosane se comporte comme un agent désintégrant et par conséquent, il n'est pas employé seul dans les formulations biomédicales et pharmaceutiques. *Mi et al., (1997)* ont rapporté que les comprimés à base de chitosane natif avaient peu de propriétés cohésives et leur passage en milieu de dissolution montrait une érosion en moins de 4 heures. Cependant, le mélange de chitosane avec des polymères anioniques comme l'alginate améliore la stabilité du support et augmente le temps de libération contrôlée au-dessus de 12 heures. D'autres types de polymères sont associés au chitosane tels que la pectine, l'hyaluronate ou le Carbomer[®] (polymère acrylique). L'utilisation d'agents réticulants permet une augmentation de la stabilité et une diminution de l'érosion du support. Ces modifications peuvent générer des systèmes d'hydrogels, formés de réseaux interpénétrés permettant de prolonger davantage le temps de libération du principe actif (*Martin et al., 2002*). De plus, de nombreux dérivés du chitosane obtenus par fonctionnalisation tels que les dérivés *N*-modifiés, le chitosane *N*-acylé ou encore *O*-carboxyméthylé et *N*-acylé sont également utilisés sous forme de systèmes contrôlés permettant d'amener le temps de libération de divers substances thérapeutiques à un moment précis ou plus retardé (*Hirano et al., 1992; Le Tien et al., 2003*). L'ajout d'autres polymères permet l'obtention d'hydrogels stables et cohésifs pouvant être utilisés comme matrice pour des systèmes de libération ou comme supports pour cultures cellulaires (*Singh et Ray, 2000*).

La plupart des utilisations du chitosane dans le domaine médical sont liées à ses propriétés cicatrisantes, hypocholestérolémiantes et immunologiques. Les modifications augmentent le potentiel d'applications au niveau cellulaire. Les dérivés amphiphiles peuvent former des systèmes micellaires permettant la solubilisation d'agents thérapeutiques, augmentant ainsi leur efficacité et diminuant la toxicité au niveau membranaire. On peut citer le cas du taxol stabilisé avec le N-lauryl-carboxyméthylchitosane qui montre un fort potentiel comme transport d'agents anticancéreux (*Miwa et al., 1998*). L'association de macromolécules (protéines ou ADN) avec les dérivés de chitosane forme des nanostructures favorisant la libération de l'agent bioactif au niveau cellulaire. Ces dérivés peuvent être utilisés dans la transfection de gènes ou la livraison de médicaments hydrophobes à l'aide de dérivés N-acylés (*Liu et al., 2003*). La transfection dans ces conditions augmente en fonction de la longueur de chaîne greffée (*Liu et al., 2003*). Les dérivés quaternisés triméthylés montrent de fortes interactions avec la charge globale de la membrane cellulaire (*Domard et al., 1986*). Ces propriétés physiques sont d'intérêt dans le domaine génique et pourraient devenir une nouvelle stratégie dans la modification d'organismes ou tout autre application médicale comme la vaccination.

- Domaines industriel et environnemental

Deux principales applications du chitosane sont exploitées dans le secteur agroalimentaire. En premier lieu, de par ses propriétés flocculantes, il permet de séparer les particules colloïdales dispersées dans les résidus des industries de transformation. En second lieu, il est utilisé comme matrice pour l'immobilisation d'enzymes ou de cellules microbiennes, animales et végétales. Les potentiels environnementaux du chitosane ont suscité un grand nombre de recherches dans le traitement d'assainissement des eaux, dans la réduction de la turbidité et dans la

stabilisation des hydrocarbures (*Muzarelli, 1973*). Le chitosane permettrait de traiter les eaux (de rinçage ou résiduelles) chargées en métaux lourds et/ou en métaux précieux de différentes sources, permettant ainsi de diminuer globalement les coûts opérationnels de l'industrie. De plus, son utilisation pourrait permettre d'enlever diverses graisses, de réduire les matières en suspension ou encore de diminuer les charges bactériennes (*Rinaudo, 2006*). Le tableau 1 présente quelques applications du chitosane dans différents domaines d'exploitation. Omniprésent dans l'industrie sous une forme ou une autre, on retrouve le chitosane en agriculture (pour protéger les plantes), dans l'industrie cosmétique (stabilisant, régénérant cellulaire, antibactérien) ou encore l'industrie du papier (propriétés mécaniques) (*Rinaudo, 2006*).

Tableau 1 : Applications du chitosane (adapté de *Rinaudo, 2006*)

DOMAINE D'EXPLOITATION	APPLICATIONS
Potentiel biomédical	Sutures chirurgicales Implants dentaires Peaux artificielles Reconstructions osseuses
Agriculture	Mécanisme défensive Stimule la croissance des plantes Enrobage (protection) Libération de fertilisants et nutriments
Traitement des eaux	Polymère écologique Pouvoirs séquestrants (métaux lourds, colorants etc.) Diminution de la turbidité Diminution des odeurs Bactéricides
Alimentaire	Non digestible (diète aux fibres) Hypocholestérolémiant Agent de conservation Stabilisateur Antimicrobien Enrobage protecteur (fruits)
Cosmétique	Crèmes Traitement de l'acné Produits hydratants Formulation de dentifrices Formulation de shampoings
Biopharmaceutique	Immunostimulants Antitumoraux Anticoagulants Bactériostatiques Libérations contrôlées (matrices)

1.2. Oligomères de chitosane : chitooligosaccharide (COS)

Même si le chitosane est reconnu comme une source potentielle de biomatériaux actifs, il montre des limitations de part son manque de solubilité à pH neutre. En effet, le chitosane n'étant soluble qu'en milieu acide, ses applications aux secteurs alimentaire et biomédical sont restreintes. L'hydrolyse du chitosane permet d'obtenir du chitosane soluble sous forme d'oligomères (COS). Du fait de leurs courtes chaînes et de leurs groupes amines libres, la viscosité des COS est plus faible et leur solubilité augmente à pH neutre. On peut considérer les COS jusqu'à un degré de polymérisation d'environ 30. Ces COS suscitent depuis peu un grand intérêt pour la santé humaine, principalement dans la nutrition et l'alimentaire. Des études ont démontré leur habilité à augmenter la qualité des aliments (stabilisation pour des produits longue-durée) ainsi qu'à améliorer la santé des consommateurs. De récentes études ont montré les effets bénéfiques des COS notamment par leurs propriétés antimicrobiennes, anticancéreuses, antioxydantes ou encore par leurs effets immunostimulants (*Jeon et Kim, 2001; Bacon et al., 2000*).

1.2.1 Obtention des COS

Les méthodes chimiques et enzymatiques sont couramment utilisées dans la production de COS. L'hydrolyse « chimique » permettrait la production à grande échelle mais présente des contraintes du fait de l'utilisation de composés nocifs pour l'environnement et de faibles rendements. L'hydrolyse enzymatique suscite un réel intérêt pour la production de COS. L'utilisation de procédés enzymatiques semble être une stratégie plus sûre présentant de faibles risques de toxicité pour l'homme et son environnement. Le désavantage majeur de ce type de procédé est l'utilisation onéreuse des enzymes mais la stabilisation de ces dernières en fait une des stratégies

demeurant toutefois la plus judicieuse pour obtenir des COS de façon sécuritaire et contrôlée.

1.2.1.1. Méthodes enzymatiques

Les oligosaccharides peuvent être produits par biosynthèse enzymatique ou dépolymérisation enzymatique. Des études ont mis en évidence la biosynthèse d'oligosaccharides à l'aide de glycosidases et de glycosyltransférases modifiées (mutées). Ce type d'enzyme permet la production de divers oligosaccharides bioactifs comme les fructooligosaccharides (FOS) ou encore des galactooligosaccharides (GOS) (Czermak *et al.*, 2004; Sangeetha *et al.*, 2005). Des cultures d'*Escherichia coli* exprimant les gènes nodC (COS synthétase) et nodBC (COS déacétylase) ont permis la production bactérienne de COS (tétramères et pentamères) *N*-acétylés (Samain *et al.*, 1997) avec un rendement de 2.5 g / L.

Outre la biosynthèse enzymatique, la dépolymérisation par hydrolyse enzymatique peut également être effectuée. Les différentes stratégies de dégradation polysaccharidique se basent sur la régio- et stéréosélectivité des enzymes microbiennes utilisées. On retrouve notamment les hydrolases et les lyases saccharidiques. Les hydrolases (EC 3.2.1.-) catalysent l'hydrolyse du lien *O*-glycosyl entre deux unités répétitives. Les lyases (EC 4.2.2.-) constituent néanmoins une catégorie d'enzymes générant un clivage des chaînes par une réaction de β -élimination donnant une extrémité non réductrice du substrat par perte d'un groupe hydroxyle (NC-IUBMB, 2007). Actuellement, ces biocatalyses sont exploitées pour la production de certains oligosaccharides bioactifs tels que les maltooligosaccharides (MOS), les GOS, les FOS, les xylooligosaccharides (XOS) (Barreteau, *et al.*, 2006). La dépolymérisation spécifique du chitosane peut s'effectuer à l'aide d'un grand nombre d'enzymes d'origine bactériennes et fongiques (Boucher *et al.*, 1992; Muzzarelli *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1998). Les chitosanases (EC 3.2.1.132) sont

définies comme des enzymes catalysant l'endohydrolyse du lien glycosidique β -1,4 des résidus *D*-glucosamine à partir de chitosane partiellement acétylé. D'autres enzymes moins spécifiques telles que les chitinases (*Ohtakara et al., 1988*), lysozymes (*Sashiwa et al., 1991*), cellulases, hemicellulases (*Yalpani. et Pantaleone, 1994*), protéases (*Terbojevich et al., 1996*), lipases (*Muzzarelli et al., 1995*), et β -1,3-1,4-glucanase (*Mitsutomi et al., 1998*) permettent la production d'oligomères de chitosane de longueurs de chaînes variables selon l'enzyme utilisée et les conditions expérimentales.

Les activités chitosanolytiques dépendent de différents facteurs. En premier lieu, le chitosane compte différents types de distribution des groupements acétyles sur le chitosane amenant ainsi un grand nombre de combinaison possible entre les unités *N*-acétylés (A) et déacétylés (D) soit A-A, A-D, D-A et D-D. En plus de la répartition des unités, la spécificité des chitosanases est dépendante de la partie réductrice et non réductrice des chaînes ainsi que du degré de déacétylation (*Brzezinski et al., 2004; NC-IUBMB, 2007*).

- Réacteurs de type « Batch »

Les réacteurs de type batch peuvent utiliser la chitosanase sous forme libre mélangée au chitosane (Fig. 1.7). Selon l'origine de l'enzyme, les conditions thermodynamiques et les caractéristiques du chitosane, l'activité chitosanolytique varie. Ainsi, avec 1% de chitosane en solution avec un DD de 99%, la chitosanase provenant de *Bacillus* sp. permet d'obtenir des COS d'un DP compris entre deux et quatre sans produire de monomères (*Izume & Ohtakara, 1987*). Différentes enzymes étudiées en réacteur « batch » permettent la production de COS. La chitosanase provenant de *Bacillus pumilus* BN-262 produit spécifiquement des pentamères et hexamères à partir de chitosane 100% déacétylé (*Kuroiwa et al., 2002*). Une cellulase

provenant de *T. viride* permet l'obtention spécifique de COS de six à huit unités (Muraki *et al.*, 1993). L'utilisation de papaïne (EC 3.4.22.2) provenant du latex de papaya et de la pronase (EC 3.4.24.31) de *Streptomyces griseus* permettent l'obtention de COS compris entre une et six unités (Vishu Kumar *et al.*, 2005) alors que *Streptomyces* N174 a permis l'obtention de dimères et trimères (Boucher *et al.*, 1992). Ce type de réacteur est cependant problématique. Ce système consomme de grandes quantités d'enzymes par réaction et celles-ci ne peuvent être réutilisées. D'autre part, les rendements moyens en COS obtenus sont faibles et la présence de chitosane de divers poids moléculaires limite l'activité enzymatique. C'est pourquoi plusieurs équipes se sont penchées sur de nouvelles approches afin de simplifier le système et d'augmenter les rendements ainsi que le contrôle de la production de COS.

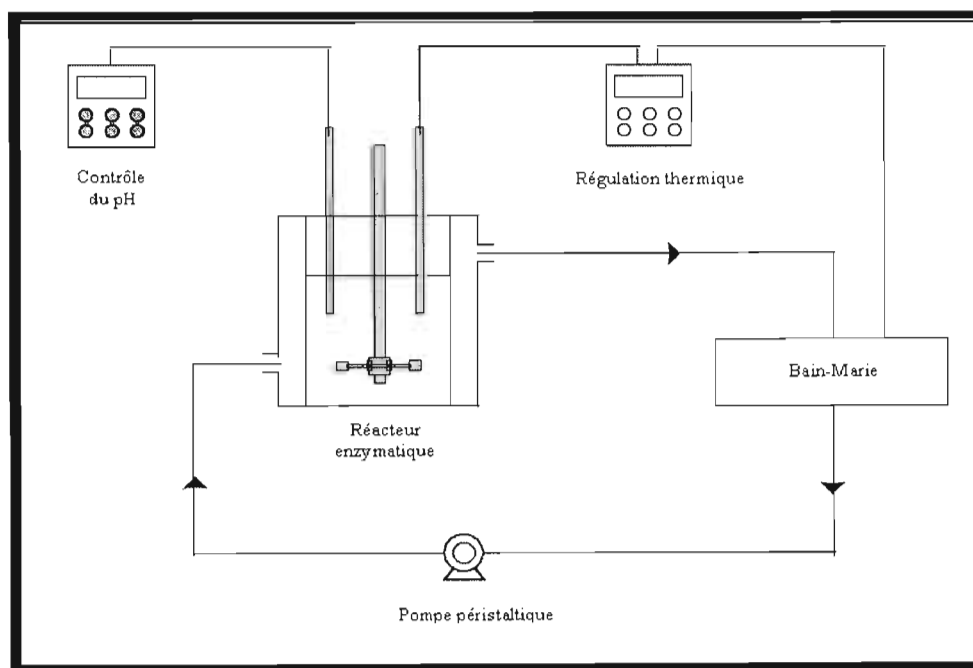


Figure 1.6 : Schéma typique du procédé enzymatique dans un réacteur « batch » adapté de Kim & Rajapakse (2005).

- Réacteur sur colonne avec enzymes immobilisées

L'immobilisation de chitosanases sur des billes de chitosane permet de garder plus de 50% de l'activité enzymatique initiale (sans dégradation des billes) après 17 jours de production de COS à flux continu (*Yamasaki et al., 1992*). Plus couramment, des supports polyhydroxyliques de type gel d'agarose réticulé sont utilisés (Sepharose, Pharmacia Co, Uppsala, Sweden) (*Kuroiwa et al., 2002*). Cette stratégie permet de pallier les désavantages des réacteurs de type « batch », en augmentant l'activité chitosanolytique, en contrôlant les facteurs influençant la formation des COS et en réutilisant les enzymes (*Ichikawa et al., 2002*).

- Réacteur avec membrane d'ultrafiltration

Pour augmenter la solubilité du chitosane en milieu aqueux et faciliter sa dépolymérisation, la production enzymatique de COS peut être améliorée par l'utilisation de membranes d'ultrafiltration laissant passer spécifiquement les molécules selon leur taille moléculaire. La perméabilité de ces membranes permet de séparer les COS, du chitosane dissout dans un même milieu. Celles-ci peuvent être adaptées à un réacteur de type « batch » permettant ainsi d'augmenter les rendements de production de l'ordre de 80 % avec une quantité d'enzymes dix fois plus faible (*Jeon et Kim, 2000*). Cette technologie montre quelques contraintes (*Lin et al., 2006, 2007; Aider et al., 2007*) car elle ne permet pas la production en continu due à la pression transmembranaire qui augmente avec l'accumulation des COS dans la membrane.

Tous ces systèmes pris séparément possèdent des avantages et certains désavantages qui peuvent être éliminés en combinant l'ensemble de ces technologies pour créer un système de production en continu à double réacteur (Fig. 1.8). En effet, une première hydrolyse du chitosane à travers une colonne (chitosanase immobilisée) permet de diminuer la viscosité du milieu ainsi qu'à éviter l'hydrolyse d'oligomères

déjà formés en plus petit COS. Un second réacteur contenant la chitosanase libre en présence de l'hydrolysate de chitosane de faible viscosité favorise de meilleurs rendements chitosanolytiques et l'ensemble du système évite le colmatage dans les membranes d'ultrafiltration. Ce système peut produire en continu des pentamères et hexamères pendant un mois, et ce, sans diminution significative des rendements et des quantités produites (*Jeon et Kim, 2000*).

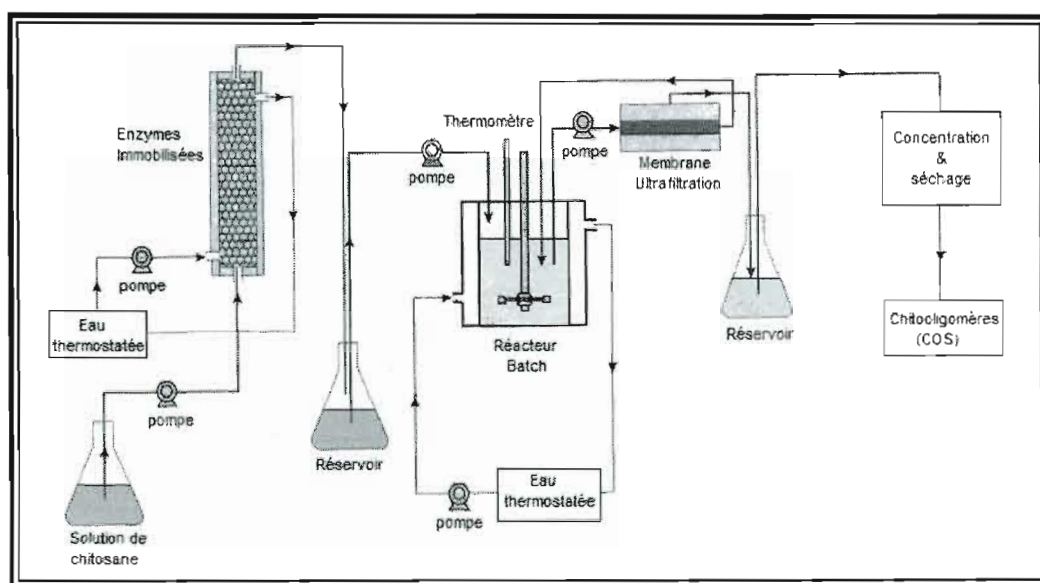


Figure 1.7 : Schéma représentant un système en continu formé de deux réacteurs enzymatiques (colonne + batch) et d'une membrane d'ultrafiltration (adapté de *Jeon et Kim, 2000*).

1.2.1.2. Méthodes physico-chimiques

Les voies physico-chimiques de dépolymérisation des polysaccharides sont nombreuses. La dégradation du lien glycosidique du chitosane peut se faire à l'aide de méthodes moins courantes telles que la dégradation oxydative en présence d'ions métalliques (*Shirui et al., 2004*), la dégradation ultrasonique (*Chen et Chen, 2000*), par irradiation gamma (*Yalpani, 1985*) ou micro-ondes (*Xing et al., 2005*).

Plus communément, différentes dépolymérisations acides sont effectuées à l'aide d'acide chlorhydrique (*Belamie et al., 1997*), d'acide nitreux (*Tommeraaas et al., 2001*), d'acide lactique (*Il'ina et Varlamov, 2004*) ou encore d'acide fluorhydrique (Fig. 1.9). L'hydrolyse acide de la liaison glycosidique a lieu par une substitution nucléophile SN1. La vitesse de réaction est proportionnelle au pH du système et augmente en fonction de l'acidité, de la température, du temps de réaction et du poids moléculaire initial du chitosane. La dépolymérisation du chitosane par HCl gazeux a récemment été proposée afin de mieux maîtriser le degré de dépolymérisation et de faciliter la préparation d'oligomères montrant un degré de polydispersité faible. Cette dépolymérisation, qui peut être réalisée sur le polymère à l'état solide, est dépendante du degré d'hydratation et de la concentration en HCl. (*Belamie et al., 1997*). *Tommeraaas et al., (2001)* ont mis en œuvre une technique de dépolymérisation du chitosane en COS à l'aide d'acide nitreux donnant comme produit final un dérivé 2,5-anhydro-D-mannose-COS très réactif. On retrouve aussi la dépolymérisation du chitosane par irradiation gamma (*Yalpani, 1985*) s'accompagnant de changements chimiques dans la structure des sucres, d'une diminution du degré de polymérisation, de la formation de nouvelles fonctions et de coupures de liaisons glycosidiques. Ces techniques sont intéressantes mais ne permettent pas pour la plupart une exploitation industrielle dû à des problèmes de faisabilité à grande échelle et aux différents facteurs de régulation physiques et chimiques.

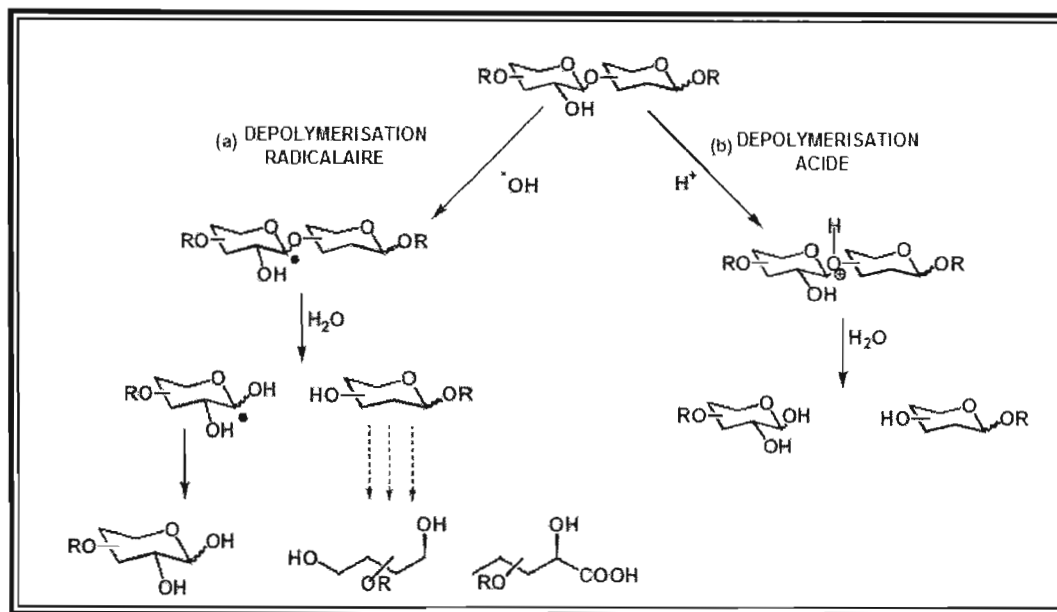


Figure 1.8 : Mécanismes types de la dépolymérisation radicalaire et acide de polysaccharides (adapté de Barreteau *et al.*, 2006).

Une autre voie chimique permettant l'obtention d'oligosaccharides consiste à la polymérisation glycosidique à partir de monomères saccharidiques. Il s'agit d'une réaction de glycosylation par condensation inter-glycosidique entre un glycosyl donneur protégé portant un groupement instable à sa position anomérique et un glycosyl accepteur avec un seul groupe hydroxyle libre (Barreteau *et al.*, 2006). Ces composés sont préparés dans des conditions douces et sont assez stables pour être facilement purifiés et stockés. La préparation des glycosyls donneurs et accepteurs demande néanmoins un grand nombre d'étapes de protection et déprotection. Cette stratégie a été employée pour produire différents types d'oligosaccharides comme des oligogalacturonides (OGA) (Magaud *et al.*, 1997), ou encore des COS d'un DP compris entre quatre et dix (Takeo, *et al.*, 1995). Le développement industriel de cette méthode demeure toutefois irréalisable car trop énergétivore.

C'est pourquoi cette stratégie de polymérisation chimique a été reprise par glycosylation enzymatique (Figure 1.9). Ainsi, *Hwang (2001)* synthétisa par cette méthode des glucooligosaccharides bifidogéniques par un procédé d'extrusion.

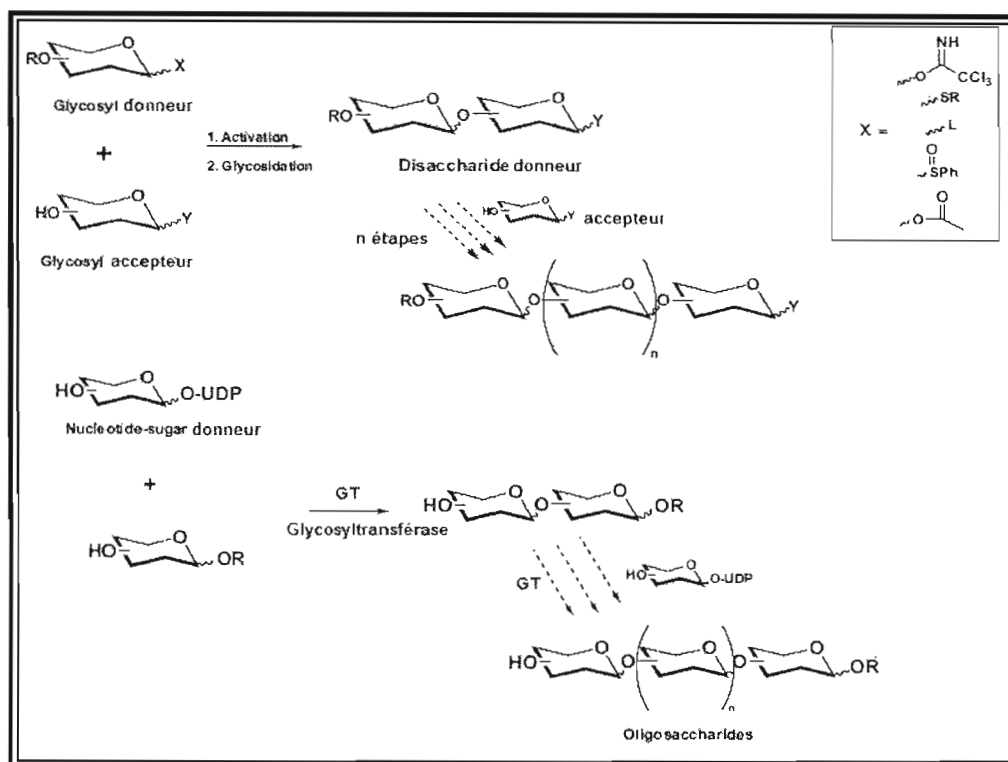


Figure 1.9 : Mécanisme général de la glycosylation par voie chimique et enzymatique. Activation chimique du sucre donneur avec des groupements de type *trichloroacetamidate*, *sulfoxyde*, *halogénure*, *thioglycoside*, *acétate*. La voie enzymatique utilise l'*UDP (Uridine DiPhosphate)* pour activer le sucre donneur (adapté de Barreteau et al., 2006).

1.2.2. Propriétés chélatantes des COS

Comme cité précédemment (1.1.3.2), le chitosane est reconnu pour avoir une forte capacité de liaison avec les ions métalliques. Ces interactions dépendent de plusieurs facteurs : la source (DP et DA) et l'état physique (gel, film, poudre, liquide) du polyaminosaccharide, la nature du cation et les conditions expérimentales. *Rhazi et*

al., (2001) ont étudié la nature des complexes formés entre le chitosane ou ses COS avec le Cu^{2+} . Les analyses potentiométriques et spectroscopiques (UV et Dichroïsme Circulaire (CD)) ont montré que le degré de polymérisation joue un rôle important dans la stabilité et le type de complexe formé. Deux structures en milieu aqueux ont été proposées dépendamment des conditions expérimentales (pH, ratio chitosane/cuivre (II)). Pour un chitosane de faible poids moléculaire (84 kDa), il a été mis en évidence des complexes à $\text{pH} > 5$ de type I $[\text{Cu}(\text{-NH}_2)]^{2+}, 2\text{OH}^-, \text{H}_2\text{O}$ et des complexes de type II à $\text{pH} < 5.8$ $[\text{Cu}(\text{-NH}_2)_2]^{2+}, 2\text{OH}^-$ (Fig. 1.4). Les études potentiométriques et en CD ont montré la formation de complexes de type I lorsque le DP est inférieur à 6. *Shahgoli et al.*, (1997) ont observé la formation de complexes stables entre un tétramère de chitosane et le cuivre (II). Il faut mentionner que dans ces conditions, un DP inférieur à 3 ne montre pas la formation de complexes stables. De plus, des études basées sur des calculs DFT (Théorie de Densité Fonctionnelle) ont permis de déterminer les complexes probables entre le Cu (II) et le Ni (II) et un COS (DP=2) (*Braier et Jishi*, 2000). Les calculs DFT indiquent que les liaisons de transition entre ces cations métalliques et le chitosane (polymères) à proximité du lien inter-glycosidique (O_g) vicinal, font intervenir une amine (N_2) et un groupe hydroxyle (O_3 ou O_6) (Fig.1.10).

La complexation des COS dépend donc de la longueur de chaîne minimale nécessaire à la formation d'un complexe ainsi qu'à la structure des COS, plus ou moins favorable à l'organisation spatiale d'un complexe avec l'ion métallique. Par conséquent, les conditions expérimentales (solution, solide, gaz, interface) vont jouer un rôle essentiel dans la formation de complexes stables.

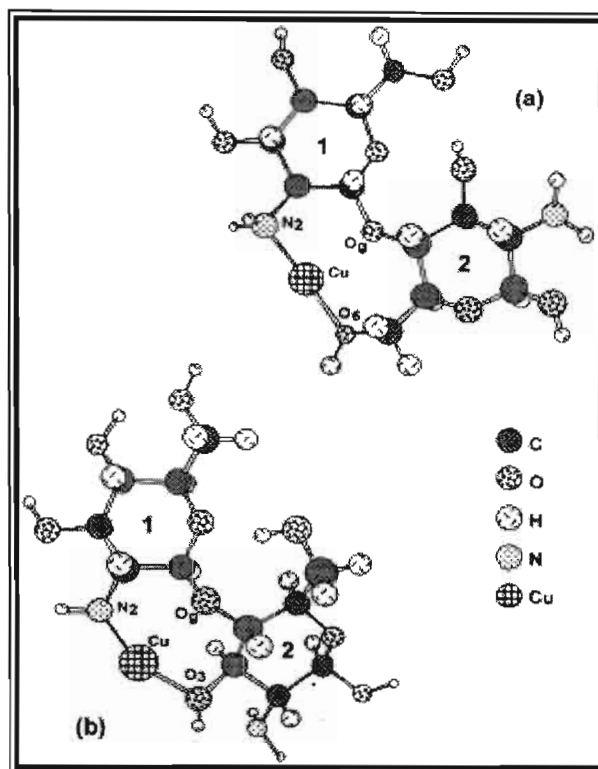


Figure 1.10 : Coordinations possibles entre les dimères et le cuivre (II). Deux structures montrant la plus faible énergie nécessaire pour former un complexe : (a) Interaction du Cu^{2+} avec N_2 , O_6 et O_8 . (b) Interaction du Cu^{2+} avec N_2 et O_3 et O_8 (extrait de Braier et Jishi, 2000).

1.2.3 Activités biologiques

Les potentiels bioactifs des COS dépendent de leur DP, leur DA, leur distribution de charges, mais aussi de leur cible (microbienne, cellule, organisme). À la différence du chitosane (polymère), les COS sont absorbés au niveau intestinal puis rapidement retrouvés dans la circulation sanguine et peuvent avoir des effets biologiques systémiques sur l'organisme ou sur les micro-organismes.

1.2.3.1 Activité antimicrobienne

Les COS montrent un intérêt industriel croissant. D'abord dans la préservation des aliments comme agent de conservation, mais aussi comme prébiotiques et antioxydants. Également, selon leurs DP et leur DA, les COS montrent différents niveaux d'activité antimicrobienne. Ainsi, des COS de 2 et 5 kDa montrent une forte activité antimicrobienne (Ueno *et al.*, 1997). Cette activité est liée au nombre de groupements amines retrouvés par type d'oligomère. Ceux-ci interfèrent au niveau de la membrane bactérienne en altérant leur perméabilité permettant l'entrée des COS dans la cellule pour finalement tuer les micro-organismes pathogènes (Sudharshan *et al.*, 1992). Choi *et al.*, (2001) ont montré l'effet d'un mélange de COS sur une souche bactérienne pathogène, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Après traitement avec les COS, ces bactéries observées en microscopie électronique (TEM et SEM) ont montré un changement morphologique passant d'une structure sphérique à des masses condensées et coagulées indiquant la séparation de la membrane cytoplasmique et de la paroi bactérienne.

De plus, du fait de leur pouvoir chélatant, les COS peuvent limiter la croissance bactérienne en interférant avec les constituants de la cellule (dysfonctionnement de la membrane plasmique, complexe avec l'ADN et les métaux) ainsi qu'avec l'environnement, privant le milieu de croissance des métaux et nutriments libres pour limiter leur multiplication (Kim *et al.*, 2003). Il est possible d'accroître les effets antibactériens des COS en dérivant les oligomères par différentes fonctionnalisations. En amplifiant la charge globale des COS en greffant par *N*-conjugaison d'asparagines en C-2, on obtient alors une concentration minimale inhibitrice (CMI) sur *E.coli* nettement inférieure aux COS natifs (Jeon *et al.*, 2001). Muraki *et al.* (1996) ont démontré que des COS d'un DP compris entre sept et huit, ayant subi une *N*-lauroylation à 50%, inhibent la croissance d'*E.coli*. Kim *et al.*, (2003) ont dérivé des COS par quaternisation des fonctions amines à l'aide de

chlorure de glycidyltriméthylammonium. Ces COS dérivés ont montré une plus forte inhibition de la croissance de *Streptococcus mutans* (Gram (+)) qu'avec les COS natifs. Les COS inhibent de façon générale la croissance bactérienne (1-5 log / cycles) à une concentration de 1% (Noa *et al.*, 2002). Cependant l'effet est limité par rapport à l'utilisation de chitosane de faible poids moléculaire. En général, les oligomères d'environ 1 kDa montrent une meilleure activité inhibitrice de la croissance des bactéries Gram (-) mais des COS de 2 et 4 kDa montrent une meilleure activité antimicrobienne sur les bactéries Gram (+). On retrouve beaucoup d'informations sur les effets antimicrobiens des oligomères montrant ainsi une variation de l'inhibition selon la souche étudiée et le DP des COS étudiés.

En plus d'inhiber la croissance bactérienne, les COS montrent aussi de fortes activités fongicides (et insecticides) (Zhang *et al.*, 2003). Le mécanisme d'action resterait le même, c'est-à-dire la formation de complexes polyélectrolytes entre les COS à la surface des cellules. Ceci a donc pour effet de diminuer la croissance fongique et de dégénérer les fonctions physiologiques. Ces effets sont plus prononcés à des pH et des températures plus bas suggérant notamment que la distribution de charge des COS est responsable de l'activité antifongique des COS (Muzzarelli, 1996).

1.2.3.2 Activités au niveau cellulaire

La masse moléculaire des COS est considérée comme l'une des principales caractéristiques responsable des activités biologiques au niveau cellulaire. De nombreuses études ont montré les bienfaits des COS par la mise en évidence d'activités antivirales, immunostimulantes, antitumorales, antioxydantes ou encore par la stimulation de diverses voies métaboliques de l'organisme.

- Propriétés antivirales

Le chitosane, comme les COS, ont permis la suppression de plusieurs infections virales dans divers systèmes biologiques. Même si les mécanismes sont mal connus, ils pourraient être dus à l'activation du système immunitaire et de défense des plantes et des animaux. En effet, le traitement en surface des plantes avec du chitosane de faible poids moléculaire (LMWC) permet de diminuer les nécroses provoquées par diverses infections virales telles que le virus de la mosaïque du tabac, par une réponse d'hypersensibilité de la plante hôte (*Pospieszny et al., 1991*). Peu d'études ont été faites sur les COS et leurs activités antivirales ; il est néanmoins rapporté que le chitosane et les COS permettent la stimulation du système immunitaire. Ainsi *Bacon et al., (2000)* ont montré que l'utilisation du chitosane en co-traitement permet d'augmenter de façon locale et systémique la réponse immunitaire face à l'influenza de type A et B. Des dérivés de COS carboxyméthylés ou sulfatés ont montré une inhibition de la réplication du HIV-1 sur des cultures de lymphocytes T et MT-4 humains (*Gama Sosa et al., 1991*). Il est donc suggéré que le chitosane comme les COS et ses dérivés peuvent diminuer le processus d'infection virale en interférant entre les glycoprotéines de surface du virus et les protéines-cibles des lymphocytes. Les COS démontrent aussi une activité antiphagique (supérieure aux LMWC (*Kochkina et Chirkov, 2000*). Les observations en microscopie électronique ont montré un changement structural des phages en présence de COS, due à une inactivation directe des protéines de surface des particules phagiques (*Kochkina et Chirkov, 2000*).

- Effets immunostimulants des COS

La réponse immune non spécifique dans un système animal est responsable de l'initiation rapide et générale de la réponse contre l'invasion de divers micro-

organismes. Certaines molécules ont pour effet une stimulation non spécifique des systèmes immuns par augmentation des activités phagocytaires des macrophages et neutrophiles. Plusieurs molécules immunostimulantes dérivées des carbohydrates (oligomannane, peptidoglycane et certains COS) présentent ce type d'activité et permettent ainsi la stimulation immune et la production de différents composés tels que des interférons, des interleukines ainsi que les protéines « compléments » (*Matsuo et Miyazono, 1993*). Une augmentation de la migration des macrophages indique un effet chimiotactique des COS. À l'inverse, le chitosane inhibe la migration de ces cellules, alors que le chitosane LMWC (Low Molecular Weight Chitosan) soluble dans l'eau permet l'activation de cytokines comme l'interleukine IL-1 β , le TNF- α ainsi que d'espèces d'oxygène réactifs (ROS) (*Jeong et al., 2000; Okamoto et al., 2002; Okamoto et al., 2003; Feng et al., 2004*).

- Activités antitumorales

Des études suggèrent que les COS inhibent la croissance des cellules tumorales (*Liang et al., 2007*). Cette activité antitumorale est due à une augmentation de la production de lymphokines dirigée par la prolifération de lymphocytes T cytolytiques et de lymphocytes NK (Natural Killer). *Quin et al., (2002)* ont montré que des COS d'un DP de quatre et cinq inhibent la croissance de cellules tumorales S180 sur des souris par administration orale et intrapéritonéale. L'inhibition de la croissance de différentes tumeurs en présence de COS et de chitosane de faible masse moléculaire semble prometteuse (Tab. 1.2). Ces observations montrent l'implication possible de ces petites molécules dans les domaines pharmaceutiques et nutraceutiques par la simplicité d'administration (orale, injection).

Tableau 1.2 : Effets des COS du chitosane sur la croissance de différents types de tumeurs murines :

COS			Type de Tumeur	Inhibition (%)	Références
MW (kDa)	DD (%)	Dose (mg/(kg/day))			
~ 1	100	10	Meth-A solid tumor	41	<i>Tokoro et al. (1988)</i>
~ 1	100	300	Sarcoma 180 solid tumor	93	<i>Suzuki et al. (1986)</i>
~ 1	100	500	MM 46 solid tumor	55	<i>Suzuki et al. (1986)</i>
6.5–12	90	10	Sarcoma 180 solid tumor	61.7	<i>Jeon and Kim (2002)</i>
1.5–5.5	90	10	Sarcoma 180 solid tumor	66.7	<i>Jeon and Kim (2002)</i>
1.5–5.5	90	50	Uterine cervix tumor	73.6	<i>Jeon and Kim (2002)</i>
1.4	85	50	Sarcoma 180 solid tumor	50.4	<i>Qin et al. (2002)</i>
3–10	80	200	Sarcoma 180 solid tumor	56.9	<i>Qin et al. (2002)</i>

- Activités physiologiques

On confère aux COS et aux LMWC diverses propriétés physiologiques. Ainsi, il a été mis en évidence l'activité anti-angiotensine I convertase (ACE) (EC 3.4.15.1) des COS, notamment le trimère. *Park et al., (2003)* et *Hong et al., (1998)* ont observé une diminution significative de l'activité de l'ACE en présence de COS. Les COS montrent aussi une activité anticoagulante lors de tests *in-vitro* sur du plasma humain (*Park et al., 2004*). Le chitosane démontre une certaine capacité d'absorption du gras, jusqu'à cinq fois son poids. En effet, *Maezake et al., (1993)* ont démontré une diminution significative du cholestérol sanguin de plus de 50% lors de traitements avec du chitosane sur des humains (3-6 g / jour pendant 2 semaines). Il a été mis en évidence l'effet hypocholestérolémiant du chitosane de faible masse moléculaire par une augmentation du niveau de HDL de plus de 10% et une diminution de 6% du

taux de cholestérol. Les COS ont la capacité de diminuer le taux de cholestérol hépatique. Le chitosane de faible masse moléculaire aurait la capacité de se lier avec des acides biliaires, ce qui aurait pour effet l'inhibition dans la formation de micelles lors de la digestion (*Gallagher et al., 2000*). D'autres hypothèses impliqueraient la sécrétion de stérols neutres en présence de COS provoquant ainsi l'excrétion des gras hors de l'organisme (*Sugano et al., 1988*). Même si ces effets diététiques sont controversés, les études *in-vivo* sur les animaux montrent de nettes propriétés hypocholestérolémiantes du chitosane (*Sugano et al., 1988, 1992; Ikeda et al., 1993*).

Toutes ces propriétés biologiques montrent que le chitosane de faibles poids moléculaires ainsi que ses COS sont des molécules intéressantes pour un grand nombre d'applications même si les mécanismes d'action moléculaires restent à être élucidés. L'incorporation du chitosane et ses COS comme additif nutritionnel est l'une de ses principales utilisations. Ils serviraient ainsi de prébiotiques et d'agent de prévention sanitaire (anticancéreux, antioxydant, hypotenseur, hypocholestérolémiant).

CHAPITRE II

Concepts de la séparation chromatographique des COS par ions métalliques immobilisés

2.1 Les méthodes chromatographiques

2.1.1 Généralités

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique qui sépare les constituants d'un mélange par répartition sélective entre une phase mobile et une phase stationnaire (solide ou liquide fixé). Chaque constituant du mélange est soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire et une force de mobilité due à la phase mobile. On peut classer les méthodes chromatographiques d'après la nature des phases stationnaires utilisées ou des phénomènes mis en oeuvre dans la séparation. Différents facteurs interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases stationnaires et mobiles dont la solubilité du soluté dans un solvant donné, la taille (forme), la polarité, la charge électrique et la présence de groupements fonctionnels. Les différents types de chromatographies résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un de ces facteurs.

On distingue cinq principaux types de séparation chromatographiques :

- *chromatographie d'adsorption*
- *chromatographie de partage*
- *chromatographie d'échange ionique*
- *chromatographie d'exclusion moléculaire*
- *chromatographie d'affinité*

- Chromatographie d'adsorption

L'adsorption est le phénomène de rétention à la surface d'un solide d'une substance en solution. Cette chromatographie liquide-solide est basée sur la partition des solutés entre l'adsorbant fixe et la phase liquide mobile. La séparation est basée sur le principe de polarité c'est-à-dire l'existence de dipôles permettant l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée : liaison dipôle-ion, ou dipôle-dipôle ou liaison de Van der Waals. Parmi les différents matériaux organiques ou inorganiques utilisés, on retrouve comme adsorbants l'oxyde d'aluminium, les silicates de magnésium et les gels de silice (*Rouessac et Rouessac, 2000*).

- Chromatographie de partage

Le partage se fait par la différence de solubilité des solutés dans deux fluides parfaitement miscibles. Un des fluides est un liquide retenu sur un support inerte et constitue la phase stationnaire. L'autre liquide constitue la phase mobile. Le facteur principal qui intervient est le coefficient de partage (K) entre chaque phase (*Skoog et al., 2003*) :

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

C_s Concentration dans la phase stationnaire

C_m Concentration dans la phase mobile

- Chromatographie d'échange ionique

Cette technique chromatographique vise la séparation des ions et des composés polaires chargés. La phase mobile est une solution tampon aqueuse et les phases stationnaires les plus courantes sont constituées de polystyrène/divinylbenzène, de silices greffées sphériques (mono dispersées), chimiquement transformées en surface (anioniques ou cationiques). Les molécules sont séparées en fonction de leurs points isoélectriques (pI) et de leurs coefficients de distribution ionique entre les deux phases. Ainsi, la chromatographie d'échange ionique peut séparer les monos et polysaccharides, les nucléosides, les nucléotides, les acides carboxyliques, les anions et cations organiques ou encore divers minéraux (*Rouessac et Rouessac, 2000*).

- Chromatographie d'exclusion moléculaire

La phase stationnaire est généralement un polymère poreux dont la dimension des pores est sélectionnée en fonction de la taille des solutés à séparer, créant un tamis à l'échelle moléculaire ayant une perméation sélective. Cette technique est appelée filtration sur gel ou perméation de gel selon la nature de la phase mobile (aqueuse ou organique). La vitesse de migration, dans la colonne, d'un composé dépend de sa diffusion dans la phase stationnaire (pénétration et porosité) donc directement de sa masse moléculaire. Le coefficient de partition s'appelle dans ce cas le coefficient de diffusion. Dans le cas d'un mélange de solutés de masses moléculaires variables, filtré sur une phase stationnaire, les molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores, seront exclues et éluées les premières. L'élution est donc réalisée dans l'ordre inverse des masses moléculaires des composés (*Rouessac et Rouessac, 2000*).

- La chromatographie d'affinité

La phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un ligand qui présente une affinité biologique (bio-affinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps). L'adsorption de la molécule à séparer sur le ligand fixé à la résine est effectuée dans des conditions physico-chimiques (pH, force ionique, concentration de la molécule à adsorber) favorables à la liaison molécule-ligand. Dans ces conditions, les molécules du mélange à séparer qui n'ont pas ou ont peu d'affinités pour le ligand sont éluées avec la phase mobile. On désorbe ensuite les molécules spécifiquement adsorbées sur le ligand en modifiant les conditions physico-chimiques (pH, force ionique, tampons) de telle sorte que la liaison molécule-ligand soit rompue (élution déformante). La désorption peut également être compétitive par ajout d'une tierce molécule qui entre en compétition avec le ligand greffé permettant de séparer par différence d'affinité des molécules d'intérêt (élution compétitive).

Le greffage de différents ligands est couramment utilisé pour la purification de différentes macromolécules d'intérêt. La chromatographie d'affinité s'est imposée au moment où les supports chromatographiques et les voies d'immobilisation se sont diversifiés (*Shiel et al., 2006*). Ainsi, l'utilisation de protéines recombinantes (*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus* du groupe G) à haute affinité pour le fragment F_c des anticorps de type IgG, permet leur purification. Les glycoprotéines sont purifiées par des lectines (concanavalin A). On emploie aussi de l'ADN natif ou dénaturé pour la purification de polymérases (ADN et ARN) ou d'exonucléases par reconnaissance spécifique de sites (*Schiel et al., 2006*). Les colorants de l'industrie textile (ex. bleu de procion ou "Cibacron blue®") sont utilisés pour la purification d'enzymes telles que des déshydrogénases ou des kinases. La structure de ces colorants étant semblable aux cycles du NAD⁺, les enzymes interagissent avec les colorants permettant leur séparation (*Kopperschläger et al., 1982*).

2.1.2. Caractéristiques et paramètres d'un système chromatographique

Le support ou la matrice constituant la base de la phase stationnaire se retrouve souvent sous forme de billes (sphériques ou irrégulières). Ces billes sont elles-mêmes des polymères de différents types :

- de styrène - divinylbenzène pour certaines résines échangeuses d'ions ;
- de polyholosides pour les gels de filtration ;
- de silice pour l'HPLC.

Différents traitements ou modifications sur les supports permettent d'obtenir des phases stationnaires spécifiques (ex. chromatographie d'affinité) (Chap.I Fig.1.5). L'élution d'un mélange de solutés se traduit par le tracé de pics chromatographiques d'allure gaussienne caractérisé par différents paramètres (Fig. 2.1).

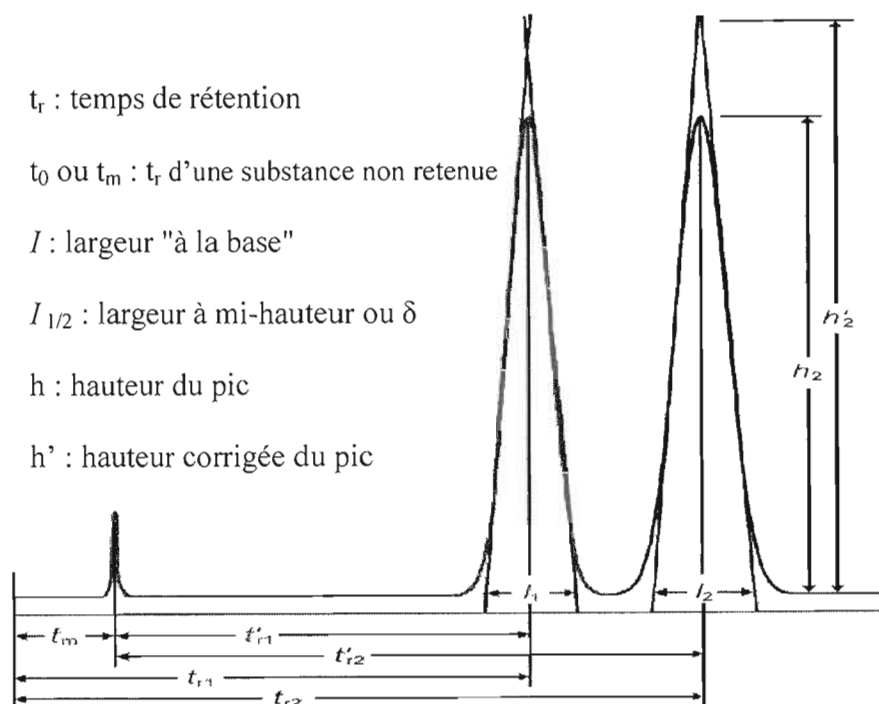


Figure 2.1 : Chromatogramme typique montrant la séparation de deux constituants d'un mélange et les différents paramètres mesurables.

Le facteur de capacité k'

Ce facteur s'apparente au coefficient de partage puisqu'il exprime le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile. Ce facteur, peut être relié au temps de rétention. Il a l'avantage de ne dépendre ni du débit ni de la longueur de la colonne (Skoog *et al.*, 2003). Il est calculé pour une substance dont le temps de rétention est t_r et $t_m = t_0$ par l'expression :

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Le facteur de sélectivité α

Ce facteur de sélectivité ou de séparation, est le rapport des facteurs de capacité de deux solutés dont on veut réaliser la séparation. La sélectivité (α) dépend de l'ensemble des interactions spécifiques, ioniques ou moléculaires auxquelles les solutés sont soumis, de la part de la phase stationnaire et de la phase mobile. Pour observer une séparation, α doit être supérieur à 1. Il s'exprime par l'équation suivante (Skoog *et al.*, 2003) :

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{(t_{r2} - t_m)}{(t_{r1} - t_m)}$$

La résolution R

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation. Deux caractéristiques déterminent le degré de séparation des pics: la distance séparant les sommets de deux pics mesurée par $t_{r2} - t_{r1}$ et la largeur des pics à la base (I). Comme le montre la Fig. 2.2, la séparation idéale est réalisée en c) où la valeur de R est un peu plus grande que 1.

Pour des valeurs de **R** beaucoup plus grandes que 1, la séparation des pics n'est pas meilleure, mais le temps de la séparation devient inutilement long.

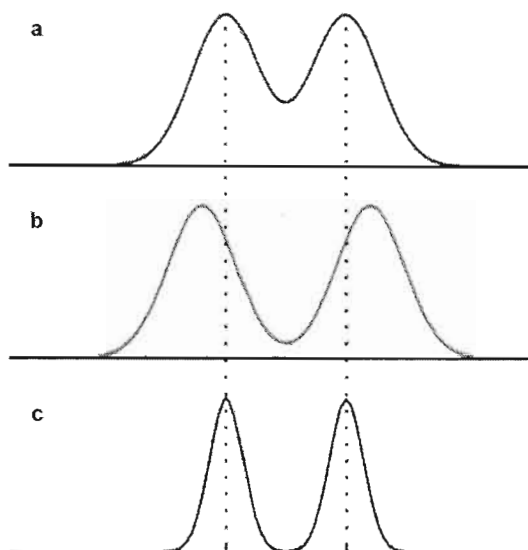


Figure 2.2. Comparaison de la résolution de différentes séparations. A) mauvaise, b) bonne, c) très bonne.

Deux composés sont séparés si la différence de leurs temps de rétention est supérieure ou égale à la somme des demi-largeurs des pics ($R \geq 1$). En fait, étant donnée la forme des pics (gaussienne) pour $R = 1$ il y a 2 % de recouvrement des composés. Une séparation est complète lorsque $R \geq 1,5$. Dépendamment du mode chromatographique employé (basse pression, FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ou HPLC), la résolution s'exprime en terme de temps de rétention (a) ou de volume de rétention (b):

$$\begin{array}{ll} \text{a)} & R = 2 \left(\frac{t_{r2} - t_{r1}}{l_2 + l_1} \right) \\ \text{b)} & R = 2 \left(\frac{V_{r2} - V_{r1}}{l_2 + l_1} \right) \end{array}$$

2.2 Chromatographie d'affinité par ions métalliques immobilisés

2.2.1 Historique

La chromatographie d'affinité sur des ions métalliques immobilisés (*IMAC*) a été introduite par *Porath et al.*, (1975). Cette méthode séparative se base sur les travaux effectués par *Helffferich* (1961), cité par *Porath et al.*, 1975 sur la séparation analytique et préparative de petites molécules par un système d'échange de ligand combinant à la fois l'échange d'ions et la chimie de coordination. *Porath et al.*, (1975) ont montré l'affinité existante entre les protéines et différents ions métalliques immobilisés sur des dérivés d'agarose ainsi que la possibilité de fractionner les protéines de milieux biologiques. Par la suite, un grand nombre de publications en rapport avec la technique *IMAC* ont permis le développement de phases stationnaires spécifiques ainsi qu'un élargissement du domaine d'application de ce système. Le système *IMAC* est employé dans le secteur biomédical pour la purification de diverses macromolécules spécifiques telles que des anticorps, des messagers cellulaires (Interférons) ou tout autre biomolécules d'intérêts (protéines, enzymes).

Sulkowski et al., (1982) initièrent une approche systématique impliquant certains résidus de chaînes d'acides aminés dans l'adsorption des protéines sur les ions métalliques chélatés. Par la suite, on postula que la présence d'un seul résidu histidine dans une protéine permet sa rétention sur du Cu^{2+} immobilisé alors que le Ni^{2+} et le Zn^{2+} retiennent les protéines possédant deux résidus histidine vicinaux (*Sulkowski*, 1989). L'utilisation de cobalt (Co^{2+}) montre l'adsorption de protéines possédant deux résidus adjacents d'histidine sur la protéine. Ainsi, plusieurs laboratoires travaillèrent à développer des alternatives pour la séparation de macromolécules. Il fut démontré que la phosphorylation, la présence de groupements carboxylates, de tyrosines ainsi que le type d'ions métalliques utilisé jouent un rôle important dans la séparation des protéines (*Andersson et Porath*, 1986; *Andersson*, 1991; *Muszynska et al.*, 1992). Diverses alternatives de sites de liaison de l'ion métallique sont utilisées pour la purification de protéines recombinantes marquées

génétiqnement avec des chaînes variables de poly-hystidines (His-X)_n en position C ou N terminale ou par mutation (*Hochuli et al., 1987; Yilmaz et al., 1995 ; Patwardhan et al., 1997 ; Patwardhan et al., 1998; Chaga et al., 1999*). Un grand nombre de techniques préparatives ont été développées pour la purification de protéines recombinantes exprimées dans des cellules procaryotes (*Botros et al., 1991; Laboureau et al., 1996*). On retrouve différents types de supports *IMAC* permettant l'exploitation de ce type d'affinité en basse pression, en FPLC, en HPLC ou en électrophorèse capillaire couplée à des analyseurs sophistiqués (ex. MALDI-TOF-MS) permettant ainsi d'étudier la fonction et la structure des protéines, des oligonucléotides ou de l'ADN (*Min et Verdine 1996; Smith et al., 1999; Barnouin et al., 2005 ; Imam-Sghiouar et al., 2005*). *IMAC* est donc devenu un outil incontournable pour la recherche et le développement mais aussi un outil industriel important pour la production de macromolécules d'intérêt biomédical (*Ndassa et al., 2006*).

2.2.2. Principe de *IMAC*

IMAC est une méthode de séparation basée sur la formation de liaisons de coordination entre des ions métalliques et certains acides aminés retrouvés sur les macromolécules. Les sites d'affinité aux métaux sont normalement occupés par des molécules d'eau et sont échangées avec certains groupes électro-donneurs de la protéine. Généralement, il s'agit de résidus histidyl (non protonés), plusieurs autres acides aminés tels que l'acide glutamique, l'acide aspartique, la tyrosine, la cystéine ainsi que les chaînes aromatiques du tryptophane et de phénylalanine contribuent à la rétention des protéines sur les phases *IMAC*. Leur participation peut être directe, par implication dans la formation de liaisons de coordination ou indirecte par la création d'un microenvironnement favorable à la liaison des résidus histidyls (*Sulkowski, 1989; Arnold, 1996*).

L'affinité existant entre les métaux et les protéines varie. La classification usuelle dans le domaine du *IMAC* est celle proposée par *Pearson (1973)*. Ce dernier a postulé que les ions métalliques peuvent être divisés en trois catégories basées sur leur réactivité préférentielle avec des atomes nucléophiles (azote, oxygène, soufre). Ainsi, on retrouve le groupe d'ions métalliques *forts*, comme le Fe^{3+} , Ca^{2+} ou Al^{3+} montrant une forte préférence à l'oxygène. La seconde catégorie regroupe les métaux de transition dits *mous* tels que le Cu^+ , Hg^{2+} , Ag^+ préférant le soufre (retrouvé dans la cystéine). Les ions de transitions *intermédiaires* (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) sont plus communément utilisés car ils font intervenir l'oxygène, l'azote et le soufre dans les liaisons de coordination.

La rétention de l'ion métallique dépend principalement de la structure du bras chélateur retenant l'ion de transition. Ainsi, on retrouve principalement des groupements chélateurs de type iminodiacétate (IDA), carboxyméthylaspartate (CM-Asp), tris(carboxyméthyl)éthylènediamine (TED), nitrilotriacétate (NTA) et le Tris(2-amino-éthyl)amine (TAE) (*Gaberc-Porekar et Menart, 2001*). La longueur du bras reliant la fonction chélatante à la phase stationnaire joue un rôle important dans l'organisation spatiale et stérique du complexe formé. La structure ainsi que la spécificité du complexe formé varient selon le groupe chélateur et l'ion de transition utilisé (Fig. 2.3). Dépendamment de la sensibilité des macromolécules au pH, de la présence de résidus d'histidyls et aux autres interactions, l'élution peut se faire par variation du pH ou de la force ionique, par un changement de tampon ou par ajout de compétiteurs tels que l'imidazole, l'histidine, l'EDTA ou l'hydroxyde d'ammonium (*Yip et al., 1989; Anspach, 1994*).

2.2.3. Spécificités des outils *IMAC*

Le mode opératoire, les conditions expérimentales ainsi que la nature de la phase stationnaire, sont des facteurs primordiaux dans l'utilisation de la technique *IMAC*. On retrouve ainsi plusieurs spécificités aux supports de type *IMAC*.

- Les supports pour applications *IMAC*

La technique *IMAC* peut s'étendre à un grand nombre de supports selon l'application voulue. Ainsi, on retrouve ce système d'affinité sur des membranes de cellulose, sous forme de gels, sous forme de billes ou à la surface de tubes de verre. Les phases stationnaires classiques sont à base de gels polysaccharidiques tels que l'agarose ou le dextrane. Les types de support *IMAC* usuels sont biologiquement compatibles, facilement activés et fonctionnalisés, mais limités par de faibles propriétés mécaniques. Les phases stationnaires sous forme de gels ou de billes réticulées à base de carbohydrate ne permettent leur utilisation qu'à basse pression et en FPLC. Pour palier cette faiblesse, d'autres supports tels que la silice granulaire ou sphérique et des polymères synthétiques (styrène, méthacrylate), permettent aussi l'obtention de supports *IMAC* pour des analyses en HPLC (*Anspach, 1994; Ren et al., 2004*). Les membranes modifiées de type *IMAC* montrent une alternative avantageuse pour la purification rapide de protéines d'intérêt en recherche ou encore dans l'industrie alimentaire pour la purification de certains jus de fruits par l'extraction d'enzymes protéolytiques (*Crawford et al., 1999; Camperi et al., 2000*).

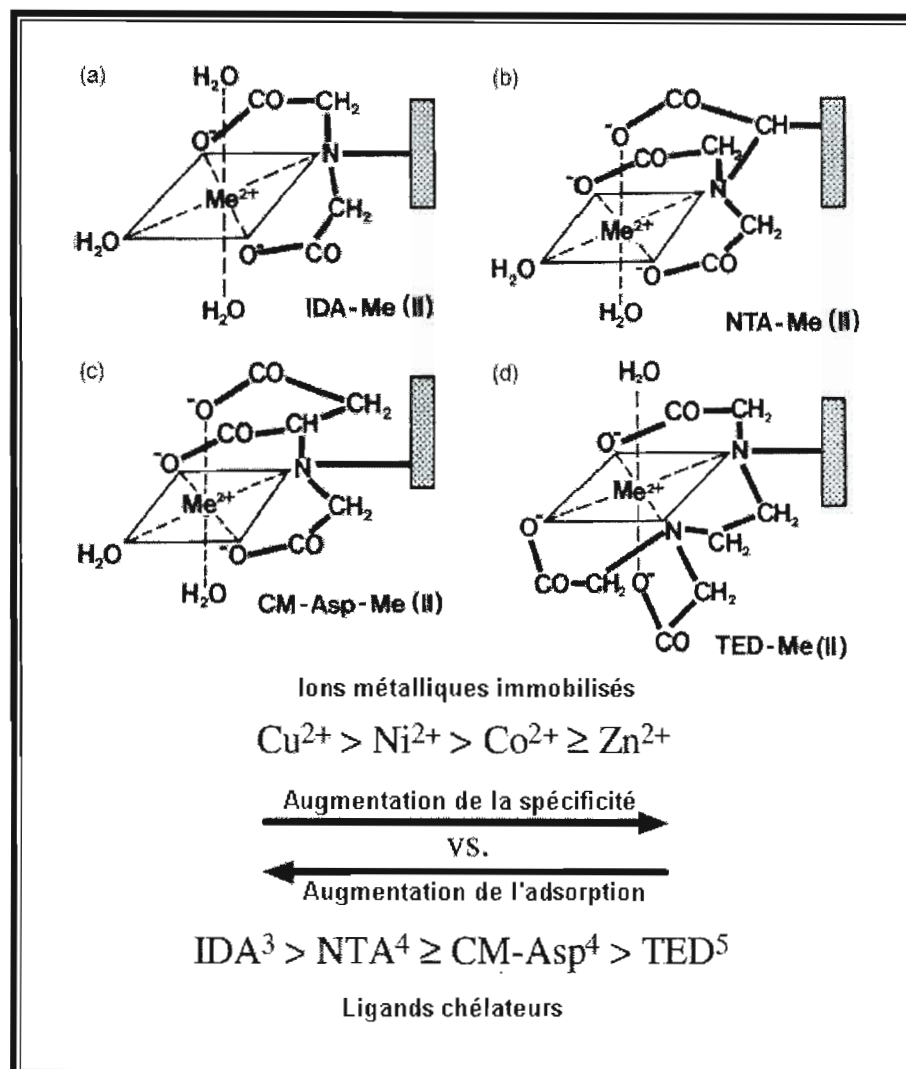


Figure 2.3. Présentation schématique des groupements chélateurs communément utilisés complexés avec différents métaux de transition. Les systèmes de coordination forment des complexes tridentat (3) (a-b), tétradentat (4) (c) ou pentadentat (5) (d). (D'après Gaberc-Porekar et Menart, 2001; Chaga, 2001).

- Activation des supports

Les supports ou les matrices utilisés pour la chromatographie d'affinité peuvent être à base d'agarose ("*Sepharose*TM", Pharmacia®), de polyacrylamide, de polyméthacrylate, d'alcool polyvinylique, de verre poreux, ou encore de silice.

L'immobilisation du ligand sur la matrice nécessite, selon la fonctionnalité voulue, qu'elle soit préalablement activée, c'est-à-dire qu'il faut créer des sites réactionnels qui permettent d'établir des liaisons covalentes (Fig. 2.5). Parmi les diverses méthodes d'activation, on peut citer l'activation des groupes hydroxyles de la cellulose par le bromure de cyanogène ou par halogénéation à l'aide d'agents tels que le chlorure de thionyle (SOCl_2), le chlorure de sulfuryle (SO_2Cl_2) (Wilchek *et al.*, 1975 ; Nilsson *et Mosbach*, 1980). Le chlorure de thionyle permet notamment le couplage de molécules possédant un groupement aminé, thiol ou phénol (Andersson *et McRea*, 1995). Les groupes hydroxyles (ou amines) des différents supports peuvent être activés par les carbonyl activés. On retrouve ainsi l'utilisation de N,N'carbonyl diimidazole (CDI), le N,N'carbonyl di-1,2,4-triazole (CDT) ou le N,N'carbonyl di-1,2,3-benzotriazole (CDB) en présence de dioxane (Ayer *et al.*, 1982; Piazza *et Medina*, 1997).

Différents produits commerciaux sont disponibles tels que Sephadex® *et* Sepharose® (Pharmacia), Bio-Gel® (Bio-Rad), Ultrogel® (IBF) et certaines sont préalablement activées et prêtes à être fonctionnalisées (greffage). À titre d'exemple, les supports préactivés sont commercialisés par Pharmacia Fine Chemicals comme le N-hydroxysuccinimide Sepharose, l'époxyde Sepharose ou le CNBr Sepharose (March *et al.*, 1974; Ayer *et al.*, 1982; Kohn *et Wilchek*, 1982). Pour obtenir des phases stationnaires économiques de type IMAC (Sepharose®), l'activation peut être faite à l'aide d'agents du type dialdéhyde (Armisen *et al.*, 1999). On retrouve ainsi le glutaraldéhyde, le glyoxaldéhyde ou encore l'épichlorhydrine formant une variabilité de la longueur de chaîne espaçant plus ou moins les groupements fonctionnels à greffer (gènes stériques) (Porath *et al.*, 1967 ; Kuznetsov *et al.*, 1993).

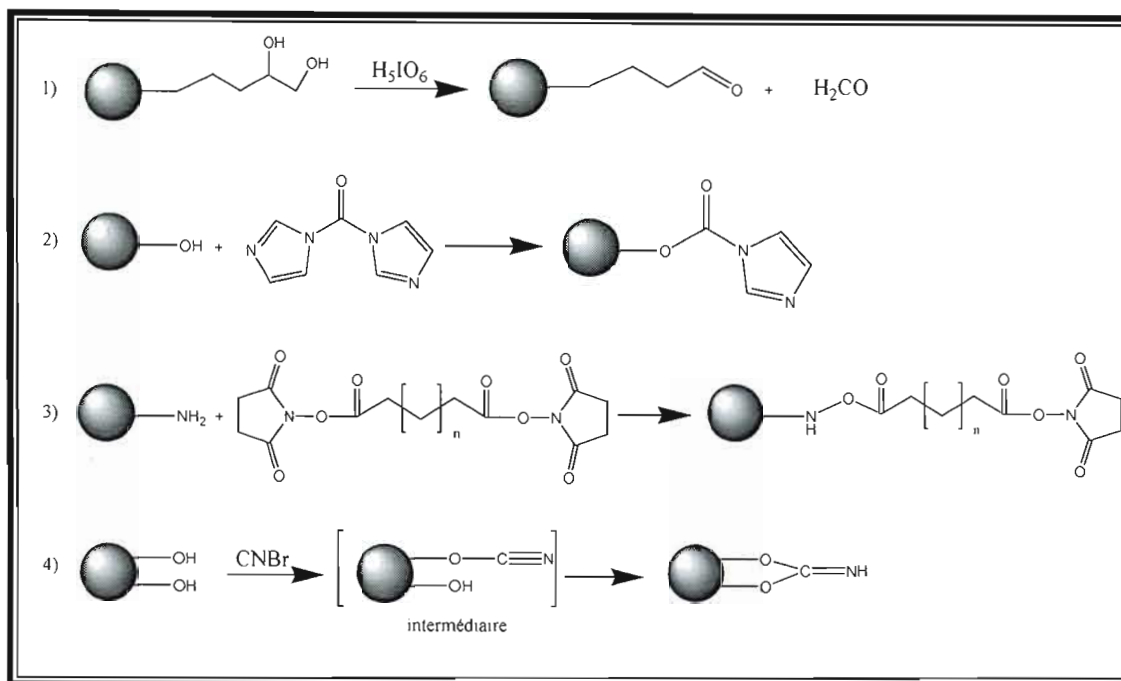


Figure 2.4 : Voies d'activation possibles de supports chromatographiques, 1) intermédiaire pour amination réductive, 2) Carbodiimidazole (CDI), 3) N-Hydroxysuccinimide (NHS), 4) Bromure de cyanogène, 5) 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane.

- Fonctionnalisation de type IMAC

Diverses stratégies de fonctionnalisation pour les supports polymériques sont possibles. Comme cité précédemment, généralement des billes Sepharose® CL-6B (d'agarose réticulé à 6%, 100 μm) peuvent être fonctionnalisées et utilisées pour les applications IMAC.

La fonctionnalisation du type IDA sur agarose peut se faire sur un support activé à l'épichlorhydrine. L'oxirane retrouvé sur le support réagit avec le groupement amine de la fonction *iminodiacétate*. Le support obtenu forme un système bidentat et/ou tridentat à pH physiologique permettant la formation des complexes tétraédriques et planaires avec les ions métalliques divalents (*Porath et al.*, 1975).

La synthèse du *carboxyméthylaspartate* ou CM-Asp sur agarose, s'effectue en plusieurs étapes. En premier lieu, il faut faire réagir en conditions basiques l'acide L-aspartique sur le support activé (épichlorhydrine). Ensuite, l'ajout d'acide bromoacétique vient réagir sur les groupements amines réactifs, pour donner un système chélateur à trois groupements carboxylates capable de former un complexe tétradentat (*Nelson et al., 1999*). La fonctionnalisation de type TED (*N,N,N'*-*tris(carboxymethyl) ethylenediamine*) est obtenue par la réaction de l'éthylènediamine avec l'oxirane de la matrice activée (épichlorhydrine) puis, en second lieu, en greffant des fonctions carboxyliques sur les fonctions amines. On obtient alors un système capable de former des complexes pentadentats (*Porath et al., 1983*). On retrouve ainsi plusieurs fournisseurs de phases stationnaires IMAC souvent à base d'agarose réticulé (Tab. 2.1).

Pour obtenir une phase stationnaire IMAC sur silice, on retrouve un grand nombre de possibilités d'activation du support. Les dérivés epoxy-silanes servent principalement de bras activateurs pour la fonctionnalisation de la silice (*IMAC*). *Figueora et al (1986)* ont synthétisé le {3-[2-(2-ethoxy)ethoxy]propyl}triethoxysilane) pour la fabrication de silice de type *IMAC*. En 1994, *Anspach* fonctionnalisa la silice *IMAC* avec l'imminodiacétate par l'utilisation de 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilane (GLYMO), de 3-Bromopropyltrimethoxysilane et de 4-aminobutyltriethoxysilane. Il est préférable de greffer la fonction sur l'agent epoxy-silane avant, mais la fonctionnalisation donne de bons rendements même effectués après immobilisation de l'espaceur activé (*Anspach, 1994*). Ces dérivés se retrouvent commercialement chez *Silicycle* et *Sigma-Aldrich*.

Tableau 2.1 : Caractéristiques de quelques phases stationnaires *IMAC* retrouvées commercialement (*Sources : manufacturiers*).

Noms commerciaux	Manufacturier	Matrices supports	Taille des billes	Fonction chélatante	Pressions supportées
<i>Chelating Sepharose Fast Flow</i>	Amersham/General Electric Health Care (United Kingdom)	Agarose réticulé 6%	45-165 μm	IDA	0.3 MPa
<i>Chelating Sepharose Big Beads</i>	Amersham/General Electric Health Care (United Kingdom)	Agarose réticulé 6%	100-300 μm	IDA	0.3 MPa
<i>Streamline Chelating</i>	Amersham/General Electric Health Care (United Kingdom)	Réticulation macroporeuse d'agarose 6% et de noyaux de quartz	100-300 μm	IDA	0.1 MPa
<i>BD Talon Cell Thru</i>	BD Biosciences (USA)	Agarose réticulé 4% (Uniflow)	300-500 μm	CM-Asp	0.06 MPa
<i>BD Talon Superflow</i>	BD Biosciences (USA)	Agarose réticulé 6%	45-90 μm	CM-Asp	0.97 MPa
<i>Profinity IMAC</i>	Bio-Rad (USA)	UNOsphere (acrylamides et vinylnes monomères)	45-90 μm	IDA	0.69 MPa
<i>Prosep-Chelating</i>	Millipore (USA)	verre à pores contrôlés	74-125 μm	IDA	20 Mpa
<i>Toyopearl AF-chelate-650M</i>	Tosoh Bioscience (Allemagne)	Copolymère d'éthylène glycol et de polymère de méthacrylate	40-90 μm	IDA	0.3 MPa
<i>Ni-NTA Superflow</i>	Qiagen (Allemagne)	Agarose réticulé 6%	60-160 μm	NTA	0.97 MPa
<i>POROS® 50 MC</i>	Applied Biosystems (USA)	Poly(styrène-divinylbenzène) réticulé	50 μm	IDA	10 MPa
<i>Sartobind Metal Chelate Membrane Adsorbers</i>	Sartorius (Allemagne)	Cellulose renforcée	-	IDA	0.6 MPa
<i>TSK-Gel Chelate 5PW</i>	Tosoh Bioscience (Allemagne)	Silice	10 μm	IDA	>10

Les méthodes utilisées pour la caractérisation des phases stationnaires sont basées sur le calcul du pourcentage d'atomes retrouvés après réaction. L'analyse élémentaire permet de déterminer, par exemple, la quantité d'azote (-IDA) greffée par rapport à une surface donnée par le calcul de la surface spécifique (BET) (*Akgol et Denizli, 2003; Poulis et al., 2007*). L'analyse FT-IR permet d'observer les changements vibrationnels dus à la fonctionnalisation. Des méthodes potentiométriques permettent le dosage des fonctions carboxyliques. Pour déterminer

la capacité de rétention en métaux des phases stationnaires, certains auteurs utilisent fréquemment l'analyse élémentaire ainsi que la spectroscopie d'absorption atomique (AAS) (Figueroa et al., 1986; Anspach, 1994).

- Base de développement d'un protocole *IMAC*

Il n'existe pas de protocole standard pour générer un système *IMAC* près pour usage. Ainsi, le chargement en métal peut s'effectuer dans différents milieux tels que des tampons, dans de l'eau nanopure, ou en milieu acide, dépendamment de l'expérimentation. L'excès d'ions métalliques est éliminé par lavages à la glycine, au tampon Tris, en présence de faibles concentrations d'imidazole ou à l'aide d'acides faibles. Le système *IMAC* doit être équilibré (pH, force ionique); c'est pourquoi, dépendamment du type de phase stationnaire *IMAC*, l'ion immobilisé et les conditions de chargement et d'équilibration doivent être adaptés en fonction de la sélectivité d'adsorption de l'échantillon par rapport aux ions de transition. Plusieurs solutions tampon tels que le phosphate, le Tris, le MOP de sodium sont retrouvées lors de l'utilisation d'ions métalliques intermédiaires. Alors que des solutions tampon d'acétate, de MES et de PIPES sont utilisées pour les ions métalliques forts (protocoles manufacturiers).

- Régénération du système

Il s'agit d'un point important car les matrices *IMAC* montrent d'excellentes possibilités de régénération. Les ions métalliques séquestrés sont facilement décrochés à l'aide de chélateurs forts et le support peut alors être successivement nettoyé, voir stérilisé selon l'emploi. Il est ainsi possible de régénérer la matrice avec de l'EDTA, par diminution du pH (acide) et par nettoyage avec de l'acide phosphorique, une forte concentration de sels et du NaOH. Ceux-ci permettent l'élimination des métaux et de toutes les substances non désirées restant dans la

matrice. On peut alors réutiliser plus d'une centaine de fois la résine chélatante sans perdre la sélectivité, la capacité et la reproductibilité (*Chaga, 2001*).

2.3. Applications du système IMAC

Plusieurs études basées sur la technique *IMAC* montrent le fort potentiel d'utilisation pour la purification pharmaceutique et industrielle de matériel biologique tel que des interférons, des vaccins, des anticorps, des enzymes et autres macromolécules bioactives (Tab. 2.2). *IMAC* offre des possibilités de production à grande échelle de différentes macromolécules d'intérêt. L'utilisation du principe d'affinité *IMAC* peut aussi s'appliquer dans le domaine environnemental. En effet, il permet l'étude de différents ligands naturels retrouvés dans les environnements aquatiques, ainsi que la dépollution des eaux contaminées par des métaux lourds ou autres macromolécules toxiques retrouvées dans les différentes sources d'eau (*Paunovic et al., 2005*). Un grand nombre d'études géochimiques portant sur l'analyse des substances humiques (acides humiques et fulviques) retrouvées dans les sols et les eaux ont été effectués à l'aide d'outils *IMAC* (*Christl et al., 2000*); cette application permet la mise en place de différents modèles géologiques ainsi qu'un impact des substances organiques sur la fertilité des sols et leur importance dans la formation de complexes naturels avec les ions métalliques. Néanmoins, à notre connaissance, le principe *IMAC* n'a jamais été appliqué pour la séparation d'oligomères saccharidiques chargés tels que les COS.

Tableau 2.2 : Applications du principe IMAC dans différents domaines d'intérêt :

Applications	Macromolécules Bioactives	Origine	Cible potentielle	Références
Biomédicales & Thérapeutiques	Protéine His-tag contre la malaria	<i>E.coli</i>	Vaccin contre la malaria	<i>Takacs et Girard 1991</i>
	Protéine (Pfs25)His-tag	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vaccin contre la malaria	<i>Kaslow et Shiloach., 1994</i>
	Simple chaîne Fv d'anticorps anti-carcinoembryonique	<i>E.coli</i>	Antitumoral	<i>Casey et al., 1995</i>
	Métalloprotéinases hydrophobiques (59 et 63 kDa) de promastigote	<i>Leishmania chagasi</i>	Modulateur de la maladie	<i>Alves et al., 2004</i>
	Facteur XII humain sous forme zymogénique (sérine endopeptidase)	<i>Plasma humain</i>	Cascade coagulation	<i>Pixley et colman , 1986</i>
	Facteur IX humain	<i>Plasma humain</i>	Cascade coagulation	<i>Feldman et al., 1994</i>
	Hormone parathyroïdienne humaine (hPTH)	<i>E.coli</i>	Ostéoporose	<i>Liu et al., 2007</i>
Outils biomédicaux	Lectines	<i>Graines de Cajun et Haricots jack</i>	Diagnostiques	<i>Naeem et al., 2006</i>
	Anticorps monoclonaux immunoglobuline G1 (Anti-TNP IgG1)	<i>Lignée cellulaire Hybridome</i>	Diagnostiques	<i>Serpa et al., 2005</i>
	Peroxydases	<i>Navets</i>	Matériel enzymatique	<i>Singh et Singh.,2003</i>
	Purification de Lactate déshydrogénase	<i>Muscle du poulet</i>	Matériel enzymatique	<i>Chaga et al., 1999</i>

CHAPITRE III

Présentation du projet de maîtrise

La mise au point de procédés de purification d'oligomères du chitosane est nécessaire afin d'exploiter pleinement les propriétés biologiques spécifiques des COS en recherche et en industrie. Un matériel chromatographique pour la séparation de COS peu onéreux et facile à utiliser devient intéressant pour l'industrie.

L'hypothèse de ce projet de maîtrise est basée sur les propriétés de complexation du chitosane et de ses oligomères avec les ions métalliques divalents. Ainsi, l'affinité des COS avec le cuivre (II) dépend du degré de dépolymérisation. Ces comportements dans le système *IMAC*, ont déjà été appliqués pour la purification de macromolécules biologiques (protéines, ADN, antigènes/anticorps).

L'objectif principal du projet était de synthétiser plusieurs matériaux chromatographiques de type *IMAC* à des coûts accessibles et de mettre en évidence une possible séparation des COS selon leur degré de polymérisation. Les autres objectifs étaient d'évaluer :

- la capacité des supports *IMAC* de chélater des ions Cu (II)
- le potentiel du système *IMAC*-Cu(II) de rétention des COS
- le potentiel de séparation des différents COS (II, III et IV) par *IMAC*-Cu(II)

Le mélange de COS (dimère, trimère, tétramère) utilisé dans ce projet a été obtenu par un procédé (non divulgué) à base de chitosanase et fourni par la société ISM Biopolymer inc. À partir des propriétés chélatantes des COS, il a été possible d'entrevoir des applications du concept *IMAC* dans les procédés de production et de purification des COS mais aussi à des chitosanes de plus hautes masses moléculaires. Les étapes dans la réalisation du projet sont présentées dans le schéma 3.1.

Les résultats obtenus font partie du manuscrit soumis à : *Journal of Chromatography A* et sont présentés à la section « Partie Expérimentale ». Ils ont

également été exposés au 1^{ier} colloque NanoQam, au 2nd colloque BioMed (UQAM, 2007) ainsi qu'au colloque de l'INAF (Bromont, 2007).

Cette recherche à la maîtrise en chimie, option biochimie, fut réalisée dans le cadre d'une collaboration subventionnée par le FQRNT action concertée (Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies) regroupant les professeurs Laurent Bazinet et Joseph Arul (U.Laval), ainsi que Monsieur Serge Brunet de l'entreprise ISM Biopolymer inc. (Granby) et mon professeur Mircea-Alexandru Mateescu (UQÀM).

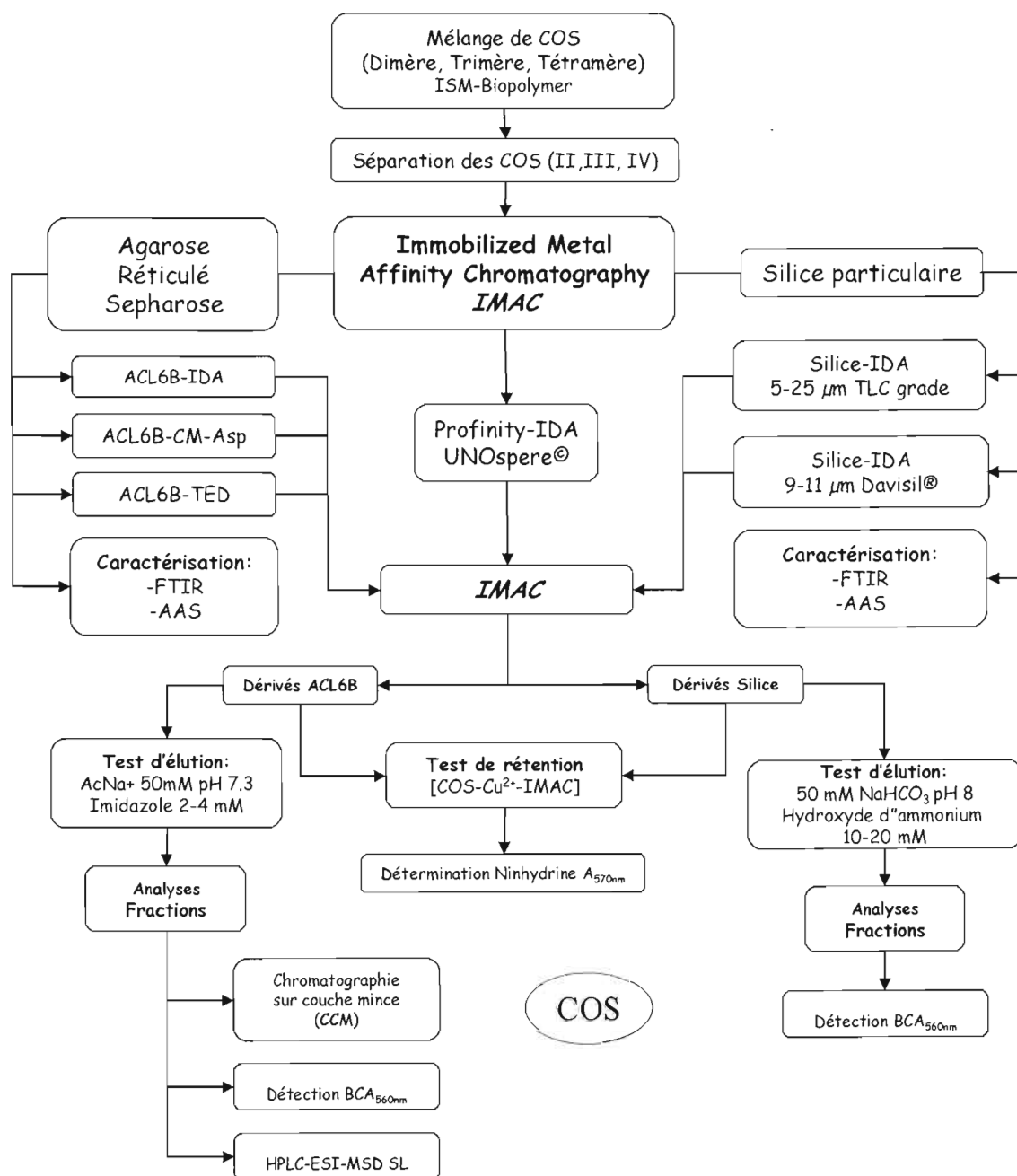


Schéma 3.1 : Organigramme des différentes étapes du projet de maîtrise.

PARTIE II
EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE IV
Séparation d'un mélange d'oligomères de chitosane par chromatographie d'affinité
sur ions métalliques immobilisés

Journal of chromatography A

Manuscript No. JCA-07-2263

Résumé : *Séparation des oligomères du chitosane par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés*

Frantz Le Dévédec, Laurent Bazinet, Alexandra Furtos, Karine Venne, Serge Brunet, Mircea Alexandru Mateescu

Les caractéristiques physico-chimiques du chitosane montrent de grands potentiels dans le domaine biopharmaceutique. Récemment, les oligomères du chitosane suscitent également un intérêt croissant pour certaines applications biomédicales et alimentaires. Suite à une hydrolyse chimique ou enzymatique du chitosane, il est possible d'obtenir différents ratios d'oligomères d'un degré de polymérisation (DP) allant de 1 à 8. Il est néanmoins difficile d'étudier leurs effets de façon individuelle tant physique que biochimique à cause de difficultés à les séparer. Ainsi, ils sont encore coûteux et peu commercialisés. Nous proposons une méthode chromatographique basée sur l'affinité entre les ions métalliques cuivre (II) et les groupements amines des oligomères de chitosane. Des matériaux polyhydroxyliques, (Agarose CL-6B et silice) ont été modifiés avec différentes fonctions chélatantes, soit un greffage d'acide iminodiacétique (IDA), d'acide aspartique carboxyméthylé (CM-Asp) ou de tris(carboxyméthyl)éthylènediamine (TED). Ces matrices ont été caractérisées (FTIR, AAS), utilisées comme phase stationnaire en HPLC pour la séparation des COS et les fractions obtenues ont été analysées en spectrométrie de masse (ESI-TOF). La capacité de rétention en oligomère de chitosane est respectivement de 6 mg/cm³, 4 mg/cm³ et 2 mg/cm³ de matrice modifiée (ACL6B-IDA, ACL6B-CM-Asp, ACL6B-TED). Les oligomères de chitosane d'un DP inférieur à 4 ont été partiellement séparés et/ou enrichis (selon la méthode employée) à 95 % pour le dimère, 70 % pour le trimère et 90 % pour le tétramère. Cette méthode peut amener à une diminution des coûts de production des COS lors de la préparation de ces oligomères.

Separation of chitosan oligomers by immobilized metal affinity chromatography

***Frantz Le Dévédec¹, Laurent Bazinet², Alexandra Furtos³, Karine Venne³, Serge Brunet⁴,
Mircea Alexandru Mateescu^{*1}***

1-Department of Chemistry & Center BioMed, Université du Québec à Montréal, CP 8888, succursale centre ville Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada,

2-Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (INAF), département des sciences des aliments et nutrition, Université LAVAL, Québec (Québec), Canada,

3-Département de chimie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada,

4- ISM BioPolymer inc., Granby (Québec) Canada.

Abstract

A novel approach for chitosan oligosaccharide (COS) separation by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) based on the differences in the interactions of chelated copper (II) ions with various COS (dimers, trimers, tetramers) is described. Polyhydroxylic chromatographic supports (Agarose CL-6B and Silica) were functionalized with various chelating functions such as IminodiAcetate (IDA), CarboxyMethyl-Aspartate (CM-Asp) and Tris(carboxymethyl)EthyleneDiamine (TED). The COS retention capacities of the columns were between 2 and 6 mg/cm³, depending on chelating group. The COS were separated and/or enriched up to 95 % for dimer and trimer and 90 % for the tetramer, with yields of 60 to 95 %.

***Corresponding author**

Abbreviations: COS (Chitooligosaccharides, Chitosan oligomers); DD (Degree of deacetylation); DP (Degree of Polymerisation); DA (Degree of acetylation); IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography); IDA (iminodiacetic acid); CM-Asp (Carboxymethyl-Aspartic acid); TED (Tris(carboxymethyl)EthyleneDiamine); FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Introduction

Chitosan, poly (1-4)- β -D-glucosamine (GlcN-GlcN) is obtained by enzymatic or alkaline heating deacetylation of chitin, a homopolymer of (1-4)-linked N-acetyl- β -D-glucosamine residues (GlcNAc-GlcNAc). It is currently obtained as polymers (30-3000 kDa) and oligomers (0.2-30 kDa). Most commercial chitosans present molecular weights ranging from 1500 and 50 kDa, with a medium deacetylation degree of 50-100% (commonly 80 to 90 %). Chitosan has a strong propensity to fix molecules such as pesticides, proteins, nucleic acids and dyes by its free amino groups. It also has a high capacity to chelate transition metal ions [1]. These chelating properties are useful for water treatment and particularly to recover trace metals from sea water [2]. There is a large interest for using chitosan as a pharmaceutical excipient (drug delivery) and food conservation agent [3] and recently a growing interest for low molecular weight chitosan and its oligomers appear, particularly for their biomedical applications [3]. In fact, Chitosan oligomers (COS) were found to exert several antibacterial activities and to act onto cell pathways and biological macromolecules depending on their degree of polymerisation (DP) and degree of acetylation (DA) [4-10]. Chitosan oligomers can be obtained by acidic treatments, radical hydrolysis, microwave, γ -irradiation, ultrasonication or by enzymatic hydrolysis to prepare large amounts of COS [11]. A major proportion of COS are obtained by specific hydrolysis with chitosanases (EC 3.2.1.132) [12]. There are other enzymes, such as chitinases (EC 3.2.1.14), pronase (EC 3.4.24.31) or papain (EC

3.4.22.2) which allow the obtention of COS, with less specificity and lower yields [13-15].

The techniques currently applied to produce COS give mixtures of oligomers, however, for biomedical studies and applications, very narrow (ideally pure) molecular weight and DP COS fractions, with well-defined biological activities are required. Several prior studies described separation of COS by gel permeation or ultrafiltration [16,17]. Capillary electrophoresis was also used to separate modified oligomers by an aminopyrene-fluorophore conjugation procedure [18]. However, these methods need rather expensive materials and equipment. Moreover, most of the currently available systems do not allow for large-scale purification of COS.

Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) is a separation procedure introduced by *Porath et al.* [19] based on the interaction between metal ions (chelated on the chromatographic support) and the histidine or cysteine on the surface of proteins to be separated. The separation procedure involves chromatographic matrices such as cross-linked agarose (ACL6B), cross-linked dextran or silica gel derivatized with chelating groups able to entrap metal ions [20]. These chelated metals ions serve as affinity ligands for various analytical targets, binding to particular surface amino acid residues. Compared with classical biological affinity ligands (antibodies, DNA, Concavalin A), chelating metal ions ligands are small, inexpensive, chemically and physically stable, with high adsorption capacity.

Various carboxymethylated amines, including iminodiacetic acid (IDA), tris(carboxymethyl)ethylenediamine (TED) and nitrilotriacetic acid (NTA) can be

used as chelating ligands [20]. For instance, IDA combines tight binding of transition metal ions with high accessibility to the resulting metal chelated for amino acid residues at protein surfaces. Since COS present strong affinity for copper ions (Cu^{2+}), in the present study, we propose IMAC as COS separation method. The DP of COS plays an important role in the interaction between Cu^{2+} and oligomers. COS with a DP of 6 is the threshold on which complexation is efficient. Glucosamine and dimer are not able to form a stable complex with Cu^{2+} [21]. This study describes a chromatographic method based on IMAC developed for the separation and purification of small chitosan oligosaccharides (II, III, IV). The chelating matrices have been obtained by derivatization of hydroxyl groups with iminodiacetic acid (IDA), carboxymethyl aspartic acid (CM-Asp) and with tris(carboxymethyl)ethylenediamine (TED) on agarose beads, as well as silica gel functionalized with IDA (scheme 1).

2. Material and methods

2.1 Materials:

The oligomers of chitosan (II, III, IV) obtained by enzymatic hydrolysis [12] were provided by ISM Biopolymer inc. (Granby, Canada) as a mix of oligomers of COS-II, COS-III and COS-IV.

Sepharose CL-6B (Agarose Cross-Linked ACL6B, 100 μm mean diameter) was obtained from Pharmacia Uppsala (Sweden). Silica gel (Davisil®) with pore size 50-76 Å, 9.5-11 μm , Silica gel (TLC grade), with pore size 60 Å, 5-25 μm , TLC silica gel plates (MERCK 60 GF-254) were from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). IMAC Profinity IDA was from BioRad® (Mississauga, Ontario, Canada).

Iminodiacetic acid, epichlorohydrin, 3-glycidoxypylmethoxysilane (GLYMO), bromoacetic acid, L-aspartic acid, ethylenediamine, ninhydrin, and hydrindantin were from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada) and the BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay Reagent was from Pierce® (Nepean, Ontario, Canada). All chemicals were of analytical or HPLC grade and were used as received without purification.

2.2 Synthesis of chelating supports

ACL6B-IDA: The chelating gel was obtained according to *Porath et Olin* [22]. Suction-dried Sepharose CL-6B (80 mL) was mixed with 20 mL of epichlorohydrin. After 30 min, 70 mL solution containing 0.01M NaOH and 4×10^{-4}

M NaBH₄ was added slowly to the slurry under gentle stirring. The reaction was continued overnight at room temperature. The oxirane-ACL6B was washed with water on a Buchner funnel, sucked to dryness and returned to the reaction flask. Then, 100 mL of a solution containing 2 M Na₂CO₃, iminodiacetic acid (3.7×10^{-3} M), and NaBH₄ (7.7×10^{-4} M), were added to the gel. The suspension was kept at 60°C overnight under slow stirring. The obtained chelating gel was washed thoroughly on a Buchner funnel with water, 0.1 % acetic acid and again with distilled water until the washing waste was neutral.

ACL6B-CM-Asp: The chelating support was obtained following *Nelson et al.* [23], with some modifications. Briefly, 80 mL Sepharose CL-6B gel bed was washed with water and mixed with 20 mL epichlorohydrin to obtain a thick suspension and maintained at room temperature for about 30 min. A volume of 70 mL solution containing 0.01M NaOH and 4×10^{-4} M NaBH₄ was added slowly and the suspension was allowed to react overnight at room temperature under mild stirring. The oxirane-ACL6B was collected by filtration, washed five times with distilled water and once with 10 % Na₂CO₃; then the gel was vacuum dried and transferred to a round bottom flask. The aspartate solution containing 5.4×10^{-3} M NaOH, 3.7×10^{-3} L-aspartic acid and 0.16 M sodium carbonate, was incorporated to the gel at room temperature at pH 11. The reaction mixture was heated to 80°C (reflux) for 4 hours, kept cooled at room temperature overnight under stirring. The gel bed was collected by filtration, washed as described for oxirane-ACL6B and transferred to a round bottom flask. A volume

of 120 mL of an ice-cooled solution containing 2.7×10^{-2} M NaOH and 6.5×10^{-3} M bromoacetic acid was added at room temperature. Then, a Na_2CO_3 solution (7.5×10^{-3} M) added, the pH adjusted to 10 (0.1 M NaOH) and the whole maintained at room temperature overnight. The *ACL6B-CM-Asp* was washed like the previous chelating gel.

ACL6B-TED: The chelating material was synthesized as described by *Porath et Olin*. [22], with minor modifications. *Ethylenediamine-agarose* ("ED-ACL6B"): Suction-dried Sepharose CL-6B was mixed with epichlorohydrin. After 30 min, 70 mL containing 0.01 M NaOH, and 4×10^{-4} M NaBH_4 was added slowly to the suspension and was allowed to react overnight under gentle stirring. The oxirane-ACL6B was thoroughly washed with water on a Büchner funnel, sucked to dryness, and returned to the reaction flask. A volume of 400 mL solution 0.2 M NaHCO_3 and 3M ethylenediamine (pH 12.5) was added to the gel and the suspension stirred overnight at 50°C. The gel was then washed on the filter with distilled water, with 0.1% acetic acid and again water to neutrality.

Tris(carboxymethyl)Ethylenediamine-agarose (ACL6B-TED): Suction-dried ED-ACL6B gel was placed in the reaction vessel and treated with a solution (100 mL) containing 0.9 M of bromoacetic acid neutralized with 2 M NaOH and 1 M NaHCO_3 (on ice bath). The suspension was stirred for 15 h at room temperature and finally washed like the previous gels.

Silica-Glymo-IDA: The chelating silica was obtained as described by *Anspach* [24,25] with some modifications for immobilization of aliphatic amines onto two different silica. Briefly, a volume of 50 mL of an aqueous solution containing 2.10^{-3} M of NaOH and 0.42 M of IDA at 0°C was treated with 5 mL GLYMO-silane solution (40% GLYMO-silane, equilibrated with 0.1M HCl at pH 4.0) and the mixture was warmed up to room temperature and maintained for 4 h. Then, the temperature was raised to 65°C and the reaction mixture stirred overnight.

The reaction medium (Silane-GLYMO-IDA) forms a stable solution. No precipitation or polymerization of the silane was observed. It can be stored at room temperature for at least 1 month under these conditions. Silica 9.5-11 μ m (Davisil®) and silica 5-25 μ m (TLC grade) were activated by 0.1M HCl for 1 h and by incubation at 90°C and 381 mmHg overnight (Isotemp Vacuum Oven). Then, 10 mL of the Silane-GLYMO-IDA solution was poured into 25 mL water and was equilibrated to pH 4.0 with 0.1 M HCl. Activated silica (9 g) was dropped into the derivatives silane solution. The temperature was raised to 95°C for 2 hours under stirring to accomplish the reaction. The obtained chelating sorbent was filtered, suspended once again in water and filtered again. The filtered sorbent was dried overnight in a desiccator and heated to 150°C at 3 Pa, in order to ensure formation of siloxane groups from most of the remaining ethoxysilane groups. This procedure improves the stability of the functionalized sorbent in water. In order to increase the substitution degree, the Silica-GLYMO-IDA (obtained in the first reaction) was treated again with Silane-Glymo-IDA, in the same conditions (double reaction).

2.3 COS separation methods

2.3.1 COS separation by FPLC (ACL6B)

The chromatographic equipment consisted of a Varian 9012 gradient pump (1 mL / min) and a Pharmacia fraction collector. IMAC gels were packed into a FPLC column Chromaflex® (150 mm x 10 mm I.D.) filled with 12 cm³ of chelating gel. Columns were washed successively with water, 100 mM EDTA and with 50 mM sodium acetate containing 0.3 M NaCl, pH 4.5. The stationary phase was then loaded with metal ions by perfusing the column with five volumes of a 250 mM CuSO₄ solution. Subsequently, the column was washed with three volumes of 50 mM sodium acetate buffer pH 4.5 and equilibrated with 50 mM sodium acetate containing 0.3M NaCl, pH 7.5. After injection of COS (1 mL containing between 10-40 mg) and elution under imidazol gradient (0-3 mM for ACL6B-IDA and 0-4 mM for ACL6B-CM-Asp), metal ions were removed from the stationary phase by perfusing the column with three volumes of 100 mM EDTA and equilibrated with buffer acetate, pH 4.5 before reloading with copper. In all cases, the column was maintained at 25°C according to the manufacturer (BioRad®) protocols. Chromatographic parameters, capacity factor (k'), selectivity (α), purity and yields were determined for each experimental condition.

2.3.2 COS separation by HPLC (Silica-IDA)

Modified Silica-IDA was packed into a stainless steel column (I.D 4.6 mm x 85 mm) at 150 bar for 15 min, with methanol. The chromatographic equipment consisted of a Varian 9012 gradient pump. The eluted samples were collected (microplates) and COS samples were detected with BCA reagent at $A_{560\text{nm}}$. Prior to separation runs, columns were washed successively with water, 0.1% HCl, water, methanol, and again water. Then, the stationary phase was loaded with the metal ions (Cu^{2+}) by perfusing the column with 5 mL of 250 mM CuSO_4 in water. Subsequently, the column was washed with 5 mL of water and the same volume of the eluent solution (50 mM NaHCO_3 , 0.3M NaCl, pH 8.0). Samples of COS were applied via injection about 1-5 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). After elution, metal ions were removed from the stationary phase by perfusing the column with 10 mL of 0.1 % HCl solution and 10 mL of water before reloaded with copper. In all cases, the column was maintained at 25°C. For separation runs, flow rates were between 0.5-1 mL / min (50 Bar) with injection of about 1-5 μg of COS.

2.3.3 Fractions analysis by LC-MS:

Separations were performed on an 1100 LC system coupled to an electrospray ionization (ESI-MSD SL) single quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies). The chromatographic column was a Luna 5 μ , CN, 150 x 4.6 mm (Phenomenex) maintained at 40°C and operated in HILIC mode at 0.5 mL/min. Chromatographic solvents consisted of 0.1 % formic acid in water (A) and 0.1 %

formic acid in acetonitrile (B). A constant composition of 85% B was sent through the column for the first 2 min. The organic content of the mobile phase was then decreased to 5 % over 4 min, held constant for an additional 3 min followed by an equilibration step for a total run time of 20 min. The mass spectrometer was operated in positive electrospray mode with two alternating acquisition signals. Mass spectra were acquired from m/z 50 to 1500 in the first MS channel while selected ions were monitored at m/z 221.8, 251.6, 332.2, 341.2 and 502.2 in the second MS channel (SIM acquisition). The electrospray voltage was set at 4 kV, the fragmentor at 70 V and the source temperature at 300°C. FPLC eluted fractions were diluted 1:5 with water and 5 μ L aliquots were injected into the LC-MS system.

2.4 Quantitative and qualitative determination of COS

2.4.1 TLC revelation of COS

To detect the presence of oligomers in the fractions collected from the chelating columns, 5 μ L from each fraction were deposited on thin layer chromatography TLC silica gel plates (MERCK 60 GF-254) and separated using a mobile phase made up of ammonium hydroxide 30%, *n*-propanol and acetonitrile (1:1:0.5). After migration, detection was done with a solution of *n*-butanol containing 0.1% of ninhydrin sprayed on the plate and heated at 100°C for 15 min.

2.4.2 Quantitative assay for “batch method”

The quantities of oligomers were evaluated by ninhydrin method [26]. The ninhydrin reagent was prepared as follows: 2 g ninhydrin and 0.3 g hydrindantin dissolved in 75 mL dimethylsulfoxide (DMSO) under nitrogen flushing and completed with 25 mL of 4M lithium acetate buffer, pH 5.2. The resulting dark red solution was further bubbled with nitrogen and conserved at 4°C for use within two days (max.) [27].

To 1 mL of chitosan solution in deionized water (in triplicate), 1 mL of the ninhydrin reagent was added from the dispenser bottle. The tubes were immediately capped, vortexed, and heated in a covered boiling water bath for 30 min. Tubes were then cooled below 30°C in a cold water bath and the content diluted with 5 mL of 50 % (v/v) ethanol/water. The solutions were then vigorously stirred on a vortex mixer (15 s) to oxidize the excess of hydrindantin. The absorbance at 570 nm was measured on a UV/VIS spectrophotometer with zero set against a similarly treated blank of water.

2.4.3 Qualitative assay of oligomers by BCA

The procedure consisted of adding 40 µL of sample (each fraction) to 150 µL of fresh working BCA reagent in the wells of a 96-samples microplate [28,29]. The plate was covered with aluminium foil and incubated at 80°C for 30 min. The plate was then cooled at room temperature for 10 min and the absorbance measured at 560

nm. The values allow tracing the chromatographic elution profile which was correlated with the TLC pattern.

2.5 Retention capacity: “Batch Method”

Chelating gels (ACL6B-IDA, ACL6B-CM-ASP, ACL6B-TED) and silica derivatives were tested for their retention capacity of chitosan oligomers (II, III, IV). The batch procedure consists in mixing gels with oligomers (100 mg) into tubes for 10 min. Briefly, a volume of 10 cm³ of each gel bed or an amount of 250 mg of chelating silica, was placed into a tube, and handled as for normal chromatographic steps (regeneration, copper absorption, and equilibration). The oligomers were equilibrated at different pH (5, 7, 9 and 11) in 50 mM sodium acetate containing 0.3M NaCl (25 mL).

The mixture was then placed into a filter system (0.22µm) and two volumes of sodium acetate solution were added in order to wash off oligomers with non specific retention. Then, COS were quantified in filtrates by ninhydrin assay. This value was subtracted from initial amount of COS (100 mg) adsorbed on the chelating materials.

2.6 Characterizations of chelating matrices

Fourier transform infrared spectra (FTIR) were obtained with a Nicolet 4700 FTIR series spectrometer, Thermo Electron Corporation (Canada). All samples were prepared as potassium bromide (KBr) pellets (8-10 % sample) and spectra recorded using the Gram 7 software under 64 scans. Copper adsorption was studied by

saturating the chelating gels in Cu(II), washing the excess, then desorbing with EDTA 200 mM and determination by Atomic Adsorption Spectrophotometer (AAS) Varian SpectrAA-220FS (USA).

3. Results and discussion

3.1 Characterization of chelating supports

FT-IR analysis provided information on the derivatization of matrices with chelating groups (scheme 1). The obtained spectra (Fig. 1.1) fit well with the expected structures of our home-made chelating matrices ACL6B (-IDA, -CM-Asp and -TED). Peaks at 2900-2800 cm^{-1} attributed to the aliphatic CH_2 and those at 1170 cm^{-1} and 1040 cm^{-1} ascribed to C-N and C-O-C stretching confirmed the presence of the chelating groups added by synthesis. These peaks were not found in the starting agarose material. Furthermore, absorption bands at 1650-1550 cm^{-1} (ascribed to C=O), at 1400 cm^{-1} ($-\text{COO}^-$) and at 1740 cm^{-1} ($-\text{COOH}$) confirmed the presence of IDA and subsequent derivatization with CM-Asp and TED groups, with protonated and non-protonated carboxylate groups, particularly for TED function. The immobilization metal capacity of ACL6B derivatives determined by AAS, showed the highest metal chelating retention on ACL6B-IDA followed by ACL6B-CM-Asp with respectively 37 and 28 $\mu\text{mol (Cu}^{2+}) / \text{mL gel bed}$ (Tab. 1). The ACL6B-TED and the commercial Profinity-IDA showed lower capacities, with respectively 20 and 24 $\mu\text{mol (Cu}^{2+}) / \text{mL gel bed}$.

According to *Prochazkova et al.* [26], the reactivity of COS and glucosamine with ninhydrin decreased with increasing DP, yielding 82, 67 and 61 % for the dimer, trimer and tetramer, respectively. In our experiments, the fast qualitative detection of the presence of COS in the chromatographic eluates was done with the BCA kit. The reactivity of glucosamine monomer and of COS with BCA showed a different order of reactivity compared to ninhydrin reaction. The highest reactivity was found for the dimer and a decrease up to 60 % for tetramer, to 40 % for glucosamine and to 12 % for the trimer was observed (data not shown). Due to lower variations of each COS (II, III, IV) reactivity with ninhydrin reagent compared to BCA, the ninhydrin assay was retained for quantitative determination of COS retention capacity on chelating ACL6B derivatives. Chelating gel structures seem to play an important role in COS binding capacity (Fig. 2). The highest retention capacity was found for ACL6B-IDA (up to 6 mg COS / cm³ at pH 7, 9 and 11) followed by ACL6B-CM-Asp with 3 mg COS / cm³ at physiological pH or higher, both of them with a higher retention than of IMAC commercial Profinity-IDA (control), with 2.5 mg / cm³ at pH 5, 7 and 11 but 3.5 mg / cm³ at pH 9. The lower retention at pH 11 than at pH 9, can possibly be related to an accumulation of sodium carboxylate, with a higher hydration at the level of chelating groups which can hinder the COS retention. The ACL6B-TED showed a COS retention capacity of about 1.5 mg COS / cm³, lower than the Profinity® control.

An additional comparative study was conducted using a commercial chelating matrix (Chelex-100 cross-linked polystyrene beads, 150-300 µm) carrying IDA groups. It provided a higher retention capacity (8 to 10 mg of COS / cm³) but did not allow

separation of individual oligomers because of concomitant copper elution (data not shown). Previous IMAC studies concerned mostly protein separation and consequently information supplied by manufacturers of IMAC chelating supports indicated only protein retention capacities. For instance, commercial IMAC supports (agarose-NTA QIAGEN, Nickel Chelating Resin from Genotech Biosciences, Proteus Metal Chelate Gel or Profinity IDA from BioRad) indicated dynamic binding capacity of 5-20 mg of protein / ml chelating gel.

The chelating silica matrix Si-IDA (5-25 μm) and Si-IDA (9-11 μm) showed characteristic modification on the FT-IR pattern (Fig. 1.2). Absorption at 2900-2800 cm^{-1} was ascribed to aliphatic chain of silane coupling agent (GLYMO), the peak at 1400 cm^{-1} was assigned to the carboxylates groups and the bands at 3500–3000 cm^{-1} , 1750–1600 cm^{-1} and 1200–900 cm^{-1} due respectively to $\nu(\text{OH})$, $\nu(\text{C}=\text{O})$ and $\nu(\text{Si}-\text{O})$ supported the expected silica modifications. Immobilized metal binding capacity measurements by AAS for copper (II), showed retention capacities of about 160 $\mu\text{mol Cu}^{2+} / \text{cm}^3$ bed of Si-GLYMO-IDA (5-25 μm) and 240 $\mu\text{mol} / \text{cm}^3$ bed for Si-GLYMO-IDA (9-11 μm) (equivalent to 408 and 506 $\mu\text{mol Cu}^{2+} / \text{g}$) (Tab. 1). Chelating silica-IDA functionalized by *Anspach* [24] demonstrated lower capacities of about 30 $\mu\text{mol Cu}^{2+} / \text{mL}$. The double reaction of the silica supports with silane-IDA increases the copper binding. The COS retention capacities in batch assays were in the range 160 mg to 200 mg of COS per g of Si-Glymo-IDA (5-25 and 9-11 μm) (Fig. 3). Compared to chelating ACL6B, the chelating silica supports were more attractive for COS preparative process in terms of retention capacities, allowing

efficient removal of the desired oligomers from reaction medium (enzymatic or chemical hydrolysis). However, separation of COS was not possible with imidazol gradient on silica derivatives due to desorption of copper. The desorption of COS from Si-GLYMO-IDA (9-11 μm) column was allowed under continued decreasing gradient of 20-10 mM ammonium hydroxide but without complete separation. Dimers were found in void volume, whereas trimers and tetramers were desorbed together after 35 min (detected with BCA). In conclusion, modified chelating silica matrices present good perspectives but further work is still required for utilization in various COS production processes.

3.2 Separation of COS on chelating supports

The HPLC-MS pattern of the COS (II, III, IV) as received from ISM Biopolymer is presented in Fig. 4. The IMAC approach allowed, in addition to the retention of the whole COS preparation, the separation of individual COS-II, COS-III and COS-IV components (Fig. 4, Fig. 5). TLC and BCA detection provided a preliminary insight of separation in the fractions collected from IMAC chelating gels (Fig. 5) whereas HPLC-MS analyses allowed the determination of COS population into each eluted fraction (Fig. 4). Different ratios of COS loading into chelating ACL6B columns lead, at higher loading, to affinity displacement between the oligomers and chelating gel, in favor of the trimer and the tetramer. At the concentration gradient elution (pH 7.3), the imidazol was the main displacer, as a competitor for IMAC binding site (Cu^{2+}) and as a “proton pump”, causing

microenvironmental acidification [30]. When buffers with low buffering capacity are used (like acetate at pH higher than 7), acidification can be more pronounced, favoring desorption of amino groups and eluting thus the oligomers. A previous test with a higher buffering capacity buffer (ie phosphate) did not allow separation, copper (II) being also eluted in these stronger conditions. The elution of ACL6B-TED and of Chelex-100 matrices, under the same conditions as for ACL6B-IDA and ACL6B-CM-Asp, didn't allow COS separation (the imidazol eluting the oligomers and the copper). Only ACL6B-IDA and ACL6B-CM-Asp were able to separate and to concentrate individual COS in our operating conditions.

In function of the amount of COS applied (20 and 40 mg) on a column, it was possible under high loading to purify each COS up to 80 % (Tab. 2). No imidazol and copper were found in the eluted FPLC fractions analyzed by HPLC-MS. Pooled fractions from HPLC-MS analysis allowed to obtain a concentrated COS solution. ACL6B-IDA with 0-3 mM imidazol gradient did not generate a sharp separation but allowed to concentrate fractions of dimer, trimer and tetramer. Dimer showed no affinity with chelating gel and was found in the void volume up to 95% in each experiment, irrespective to the COS loading (20 and 40 mg). In the case of 20 mg column loading, the capacity factor k' was 10.18 for the trimer and 11.18 for the tetramer, with a selectivity coefficient α_{IV-III} of about 1.10. However, at low COS loading (10 mg) on ACL6B-IDA column with smaller diameter (0.5 cm), more than 85% of dimers were retained into the column (same gradient) with k' of 8.7 for dimer, 9.8 for trimer and 10.4 for tetramer and poor selectivity (α_{III-II} 1.13 and α_{IV-III}

1.06). This confirms the affinity of the dimer for chelating groups and a possible affinity displacement between COS in favor of retained trimers and tetramers and a lesser microenvironmental acidification at low loading. Therefore, the dimer, trimer and tetramer relative ratio in the mixture modulate affinity between the individual oligomers and copper (II) via protonation of amino groups.

According to *Rhazi et al.* [21], COS with an average degree of polymerization (DP) lower than 3.5, are not able to form a stable complex (type I) with copper (II). Other potentiometric and tandem electrospray-mass spectrometry studies have confirmed formation of complexes between mono-, di- and tetramers of chitosan with transition metal ions such as copper (II) [31]. For the tetramer, the major species was supposed to be (at pH 7) a neutral copper complex, where Cu (II) seems to be coordinated by the C(1)-alkoxide, by the four amine nitrogens of chitosan tetrasaccharide and a counter anion [31]. Theoretical density functional (DFT) calculations did not suggest this interaction [32]. For a structure to include these atoms, it would need to be in a higher energy regime as, for example, in a “boat” conformation of amino-glucose units. This type of conformation could be generated in the ionization source of the mass spectrometer. Experiments on the dimer indicate that one nitrogen atom is involved in the coordination. DFT studies indicate that transition metal (Cu (II) and Ni (II)) coordination with the chitosan takes place in the vicinity of the glycosidic oxygen and includes interactions with nitrogen and hydroxyl oxygen atoms [32]. Accordingly, COS have shown ability to complex

copper (Cu^{2+}), but complexation depends on the physical state (solid, solution, gas), on the counter ions (chloride, nitrate, sulfate) and on the environmental system.

The type of chelating functional groups play an important role in the binding affinity between COS and Cu^{2+} . For instance, ACL6B-IDA and ACL6B-CM-Asp show respectively tridentate and bidentate complexes with Cu^{2+} depending to the experimental conditions [33]. Oligomers, following our potentiometric titration (data not presented) showed at pH 7.0 less than 50% of amino groups unprotonated. They can interact with copper (II) allowing three or two potential interaction (links) depending to the ACL6B chelating types. This could explain good retention and possible different displacement of COS onto chelating gels.

At higher loading (40 mg) on ACL6B-IDA and elution with a 0-3 mM imidazol gradient, an overloading displacement between the trimer and the tetramer with partial overlapping peaks was observed. The ACL6B-CM-Asp column (12 cm^3) loaded with 40 mg of COS and eluted with 0-4 mM imidazol gradient, showed the same overlapping trimer and tetramer peaks. At 20 mg COS loading, the dimer was not retained whereas the retention times were 123 min for the trimer and 134 min for the tetramer on ACL6B-IDA and respectively 89 and 100 min on ACL6B-CM-Asp, both columns giving almost complete separations. At 20 mg of COS loading, trimers and tetramers were separated on ACL6B-CM-Asp under 0-4 mM imidazol gradient with yields up to 95% and COS purity of 90% (Fig. 6). The ACL6B-CM-Asp elution were given a k' of 5.84 for the trimer and 6.79 for the tetramer (dimer not retained

and eluted into the void volume) and selectivity α_{IV-III} of 1.15, allowing a total separation of COS according to the HPLC-MS analysis (Tab. 2).

The presented results suggest that IMAC processes could also be applied jointly with other ultrafiltration or electrodialytic procedures [17] for extracting oligomers during an enzymatic chitosan processing.

Conclusion

The present work provides an attractive IMAC procedure for small COS separation and purification. Separation is possible with low cost material such agarose ACL6B beads (mean size 100 μm) functionalized with chelating groups. Interesting yields and purification up to 90% were obtained with high COS loadings of the columns. The separation process can potentially be improved using smaller sized agarose beads (ie 10 μm). Agarose or silica supports have shown high retention of COS and, depending on the desired application, can be applied at different steps of a large-scale COS production. This technique would be useful for preparative approaches at analytical and research laboratory scale, as well as at industrial scale.

Acknowledgements

Thanks are due to FQRNT (Quebec Government) for supporting this project.

References :

- [1] S.E. Bailey, T.J. Olin, R.M. Bricka, D.D. Adrian, *Water Res.* 33 (1999) 2469.
- [2] E. Guibal, *Sep. and Purif. Tech.* 38 (2004) 43.
- [3] M. Rinaudo, *Prog. Pol. Sci.* 31 (2006) 603.
- [4] P.J. Park, J.Y. Je, H.G. Byun, S.H. Moon, S.K. Kim, *J. Microbiol. Biotechnol.* 14 (2004) 317.
- [5] H.J. Yoon, M.E. Moon, H.S. Park, S.Y. Im, Y.H. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358 (2007) 954.
- [6] C.-W. Lin, L.-J. Chen, P.-L. Lee, C.-I. Lee, J.-C. Lin, J.-J. Chiu, *Biomaterials* 28 (2007) 1355.
- [7] E. Mendis, M.-M. Kim, N. Rajapakse, S.-K. Kim, *Life Sci.* 80 (2007) 2118.
- [8] M.M. Issa, M. Koping-Hoggard, K. Tommeraas, K.M. Varum, B.E. Christensen, S.P. Strand, P. Artursson, *J. Controlled Release* 115 (2006) 103.
- [9] F.C. MacLaughlin, R.J. Mumper, J. Wang, J.M. Tagliaferri, I. Gill, M. Hinchcliffe, A.P. Rolland, *J. Controlled Release* 56 (1998) 259.
- [10] P.J. Park, J.Y. Je, S.K. Kim, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 4930.
- [11] S.-K. Kim, N. Rajapakse, *Carbohydr. Polym.* 62 (2005) 357.
- [12] I. Boucher, A. Dupuy, P. Vidal, W. A. Neugebauer, R. Brzezinski, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38 (1992) 188.
- [13] T. Kuroiwa, S. Ichikawa, S.Sato, S. Mukataka, *Biotechnol. Bioeng.* 84 (2003) 121.
- [14] D. Somashekar, R. Joseph, *Bioresour. Technol.* 55 (1996) 35.
- [15] A.B. Vishu Kumar, M.C. Varadaraj, L.R. Gowda, R.N. Tharanathan, *Biochem. J.* 391 (2005) 167.
- [16] A. Domard, N. Cartier, *Int. J. Biol. Macromol.* 11 (1989) 297.
- [17] F. Lin Teng Shee, J. Arul, S. Brunet, L. Bazinet, *J. Membr. Sci.* 290 (2007) 29.
- [18] M.-E Beaudoin, J. Gauthier, J. Boucher, K.C. Waldron, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1390.
- [19] J. Porath, J.A.N. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* 258 (1975) 598.
- [20] V. Gaberc-Porekar, V. Menart, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 335.
- [21] M. Rhazi, J. Desbrieres, A. Tolaimate, M. Rinaudo, P. Vottero, A. Alagui, *Polymer* 43 (2002) 1267.
- [22] J. Porath, B. Olin, *Biochemistry* 22 (1983) 1621.
- [23] P.S.Y. Nelson, Te-Tuan; Kain, Steven R., in, CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), United States, 1999.
- [24] F.B. Anspach, *J. Chromatogr. A* 676 (1994) 249.
- [25] F.B. Anspach, *J. Chromatogr. A* 672 (1994) 35.
- [26] S. Prochazkova, K.M. Varum, K. Ostgaard, *Carbohydr. Polym.* 38 (1999) 115.
- [27] S. Moore, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 6281.

- [28] L.W. Doner, P.L. Irwin, *Anal. Biochem.* 202 (1992) 50.
- [29] S. Jarle Horn, V.G.H. Eijsink, *Carbohydr. Polym.* 56 (2004) 35.
- [30] S. Eugene, *J. Mol. Recogn.* 9 (1996) 494.
- [31] M. Shahgholi, J.H. Callahan, B.J. Rappoli, D.A. Rowley, *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 1080.
- [32] N.C. Braier, R.A. Jishi, *THEOCHEM* 499 (2000) 51.
- [33] E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher, *J. Chromatogr. A* 411 (1987) 177.

Scheme 1. Hypothetical structures of IMAC chelating groups and of Cu(II) complexation with IDA-Cu²⁺, CM-Asp-Cu²⁺ and TED-Cu²⁺. Spacers to the ACL6B are made with epichlorohydrin (C₃).

Fig. 1 FT IR profiles of agarose (1) and silica (2) derivatives: ACL6B-CM-ASP (1a), ACL6B-IDA (1b), ACL6B-TED (1c), ACL6B (1d) and modified silica-IDA 5-25 μm (2a), modified silica-IDA 9.5-11 μm (2b) and silica gel Davisil® (2c). Samples (5 mg) were compressed with KBr (65 mg) at 4 tones. Spectra were recorded and normalized with a Nicolet FTIR series spectrometer (64 scans at 2 cm⁻¹).

Fig. 2 Relative retention capacity of COS on 10 mL of various chelating gels (ACL6B-IDA, ACL6B-CM-ASP and ACL6B-TED). Loaded with 100 mg of oligomers in 50 mM sodium acetate containing 0.3 M NaCl at different pH values; unretained COS were quantified by ninhydrin at 570 nm.

Fig. 3 Relative retention capacity of COS on 250 mg of silica (Silica-GLYMO-IDA 9.5-11 μm , Silica-GLYMO-IDA 5-25 μm) and unmodified silica Davisil® as control. The matrices were loaded with 100 mg of oligomers in 50 mM sodium acetate containing 0.3 M NaCl at different pH values; unretained COS were quantified with ninhydrin at 570 nm.

Fig. 4 HPLC-MS-Q analysis of ISM Biopolymer COS mixture (II, III, IV) using an Agilent 1100 device coupled to LC/MSD-SL, with a Luna CN 5 μm column (150 x 4.6 mm). Injection was of 5 μL of diluted COS samples 1/5, with mobile phase water / acetonitrile (85/15, 5/95, 85/15).

Fig. 5 Chromatographic profile of COS on ACL6B-CM-Asp column (12 cm³). Elution was done with an imidazol gradient (2-4 mM) at 1 mL / min. COS were detected in each fraction (50 μL) with BCA reagent kit (150 μL). Pattern was correlated with TLC migration for each IMAC sample fraction (5 μL) with mobile phase (NH₄OH/*n*-propanol/acetonitrile) and oligomers detection by ninhydrin (0.1 % in *n*-butanol) reagent.

Fig. 6 Relative population area of COS on ACL6B-CM-Asp column (12 cm³) eluted under imidazol gradient (2-4 mM) with 3 min equilibration in 50 mM sodium acetate containing 0.3 M NaCl, pH 7.2 at a flow rate 1 mL/min. Peaks areas obtained by HPLC-MS-Q of each IMAC fraction were correlated with the TLC pattern and BCA assay profile.

Scheme 1

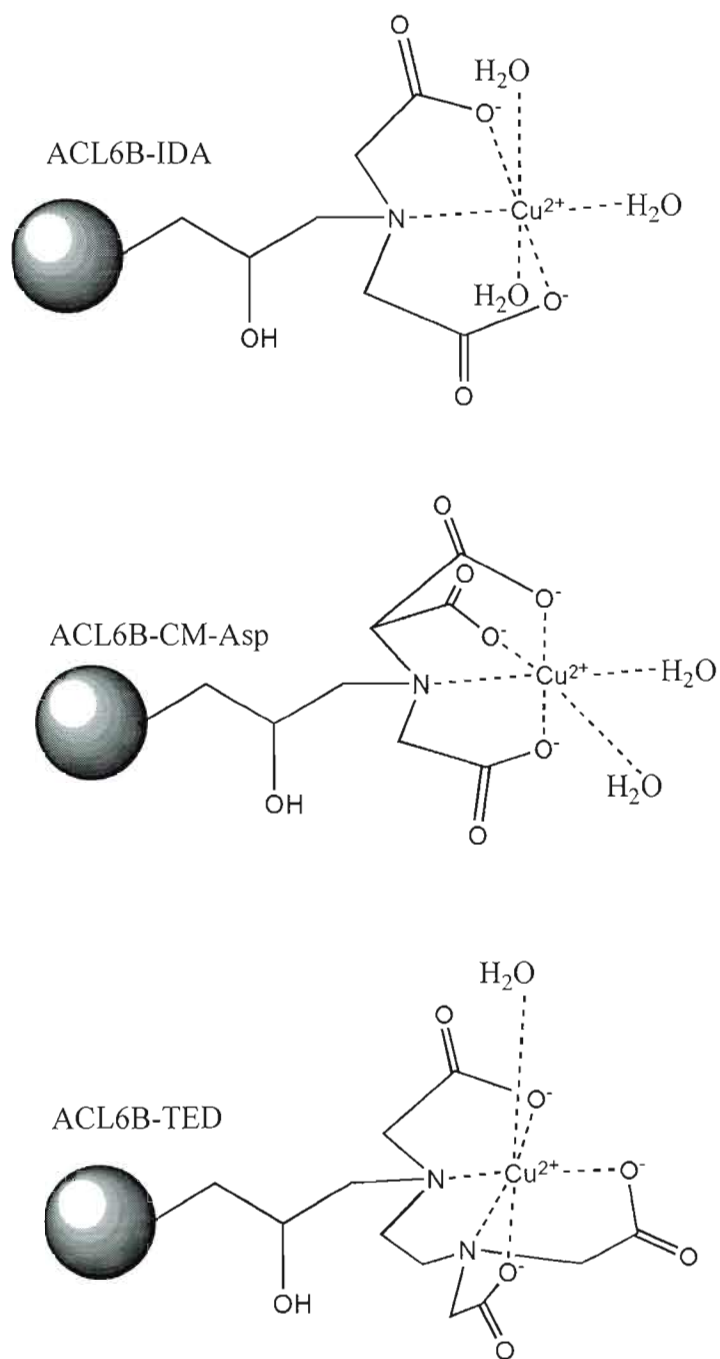


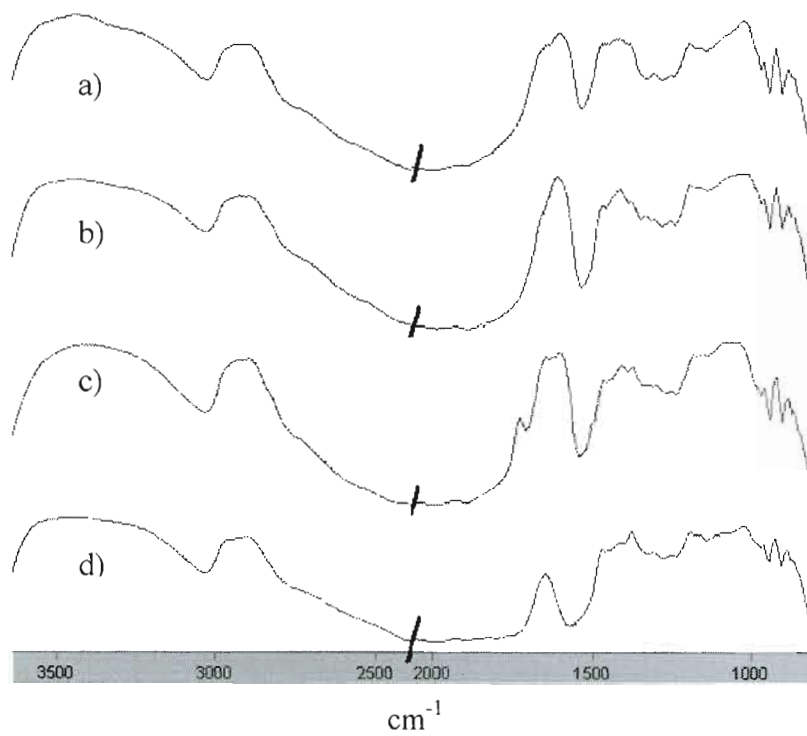
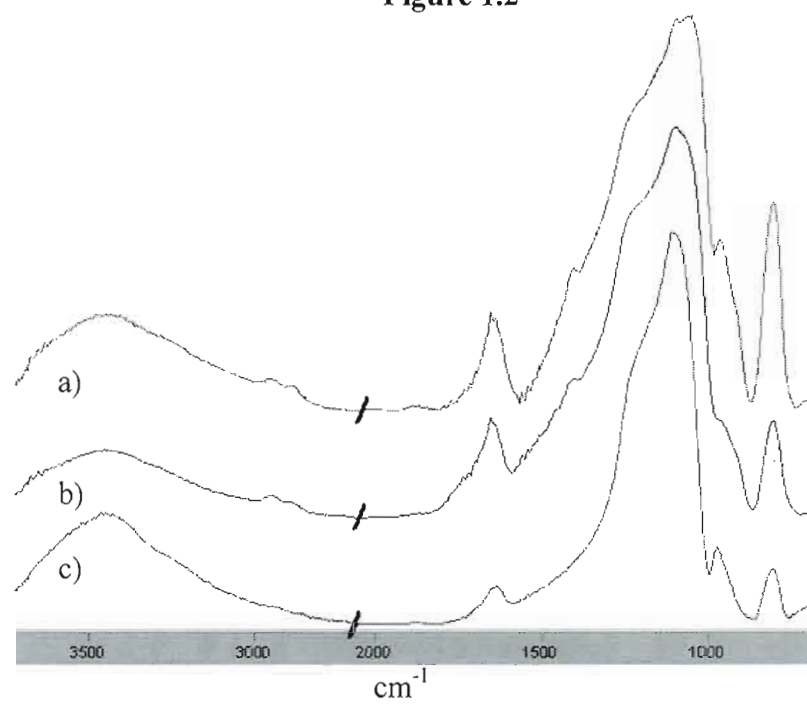
Figure 1.1**Figure 1.2**

Figure 2

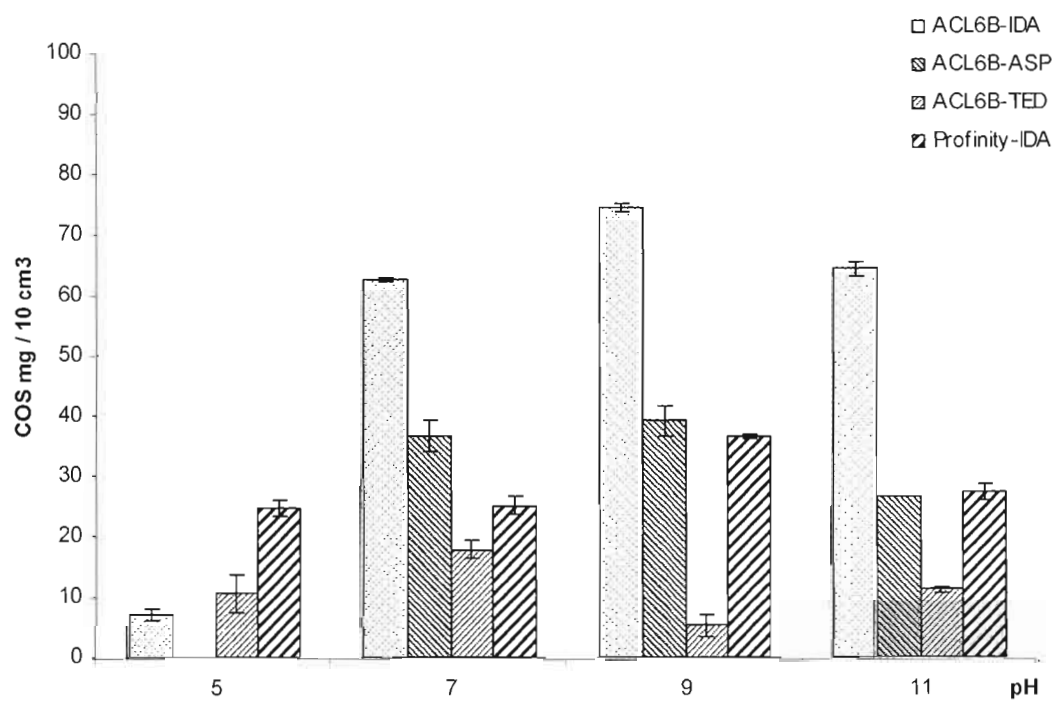


Figure 3

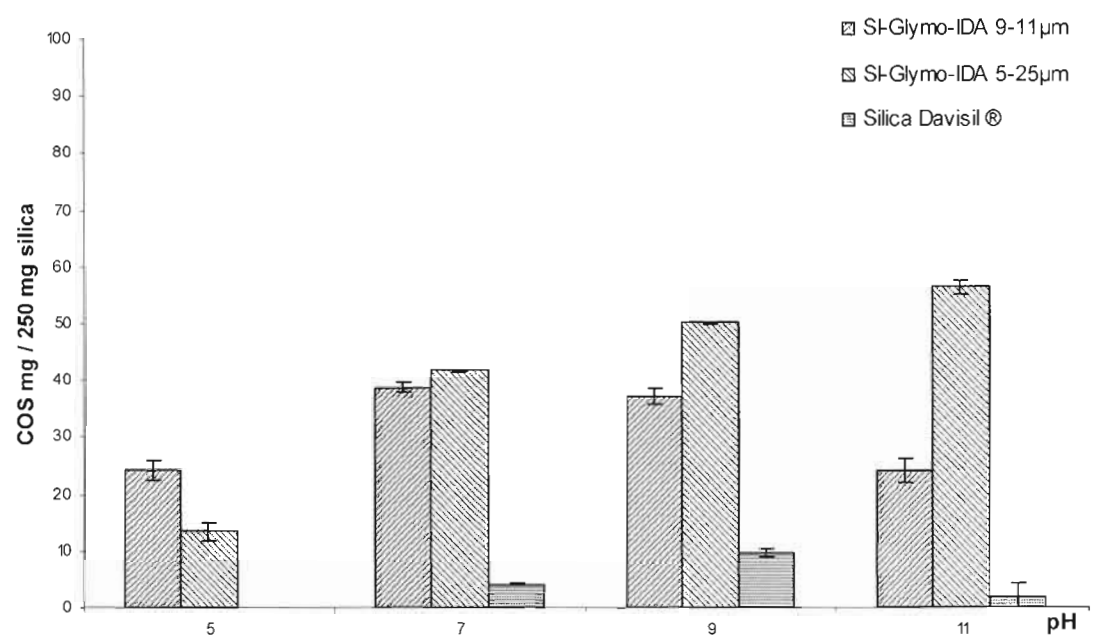


Figure 4

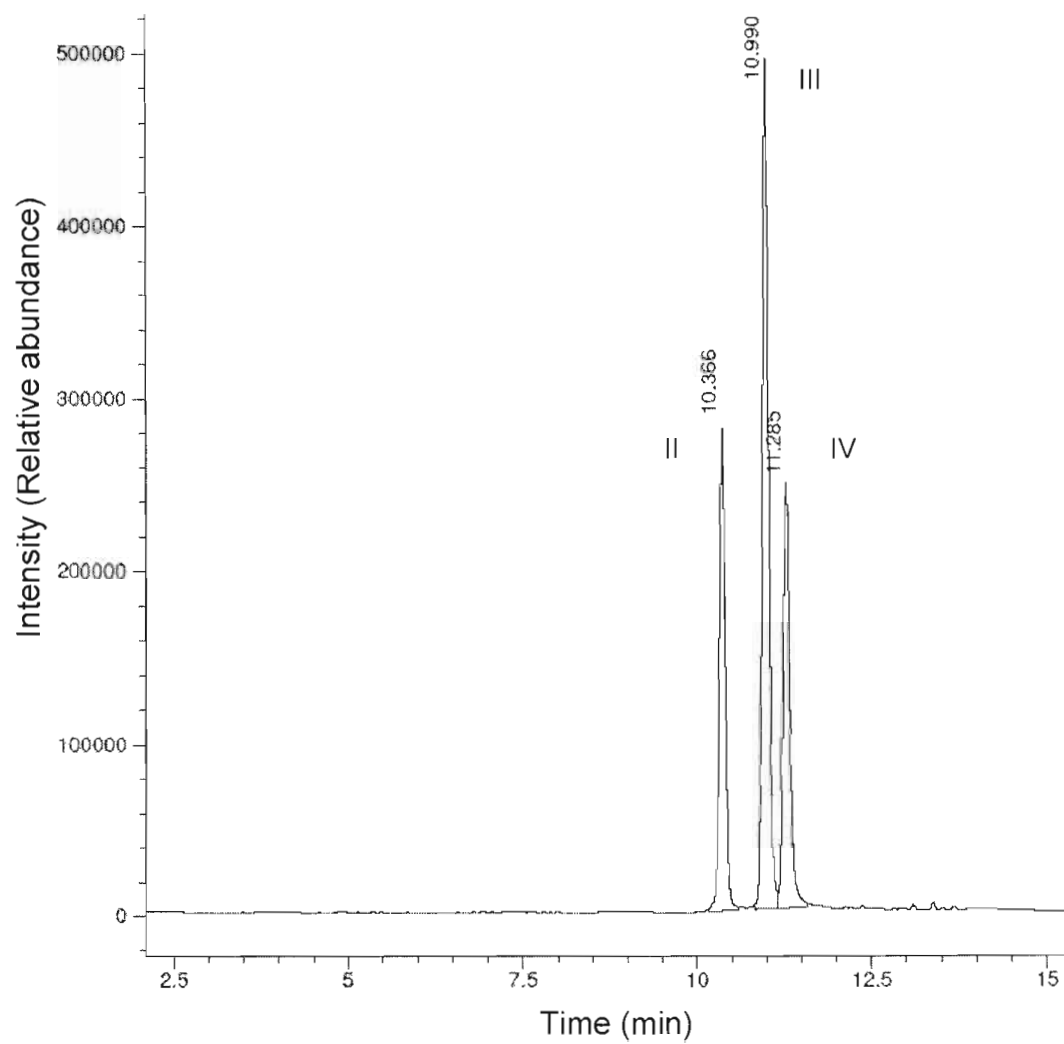


Figure 5

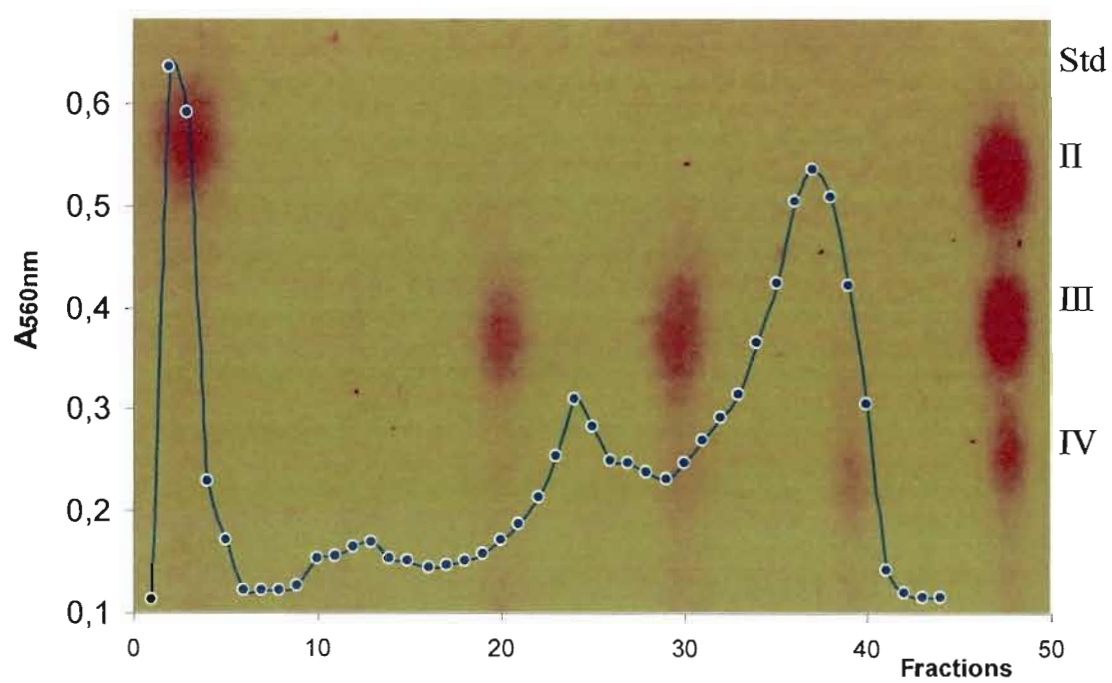


Figure 6

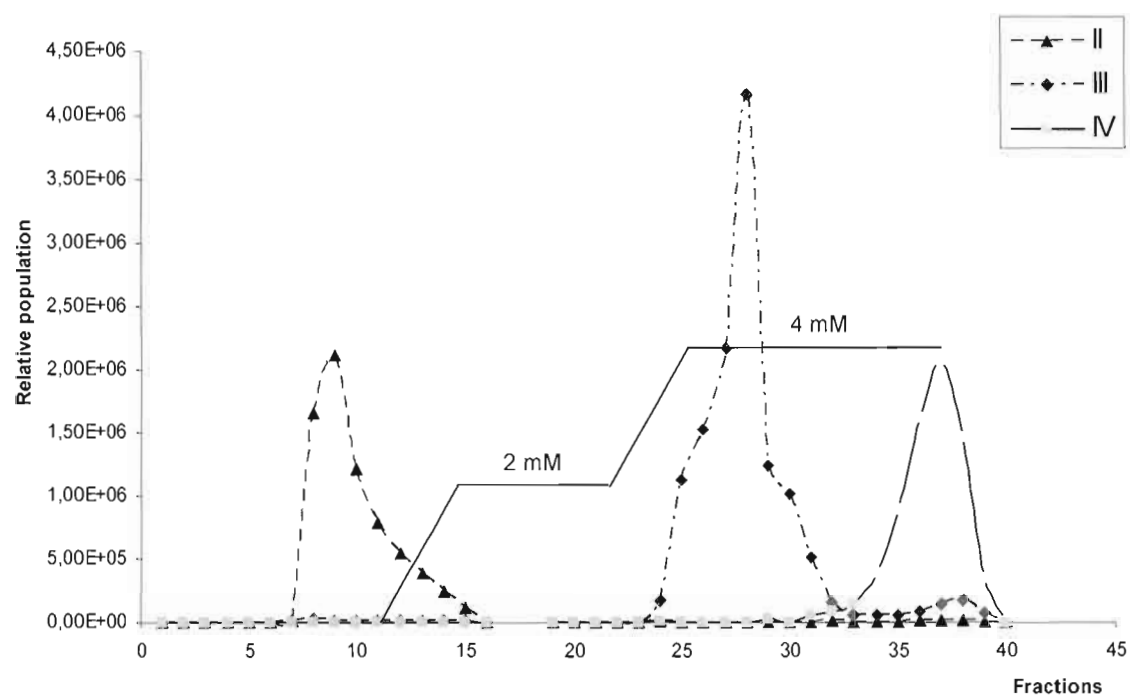


Table.1 Retention capacity of Cu^{2+} of different IMAC chelating matrices (ACL6B-IDA,-CM-Asp,-TED and silica-IDA). The chelating matrices (5 mL of ACL6B derivatives or 1 g of silica-IDA) were eluted with 200 mM EDTA and copper (II) desorption was determined by Atomic Absorption Spectrophotometer in duplicate

Matrix	Particles size	Desorption	$\mu\text{mol/mL}$
ACL6B-IDA			37
ACL6B-Asp	45-165 μm	200 mM EDTA	27
ACL6B-TED			20
Profinity-IDA	45-90 μm		24
Si-IDA 5-25	5-25 μm		160
Si-IDA 9-11	9-11 μm		200

Table 2. Separation of COS. Purity and yields of pooled fractions (F) obtained by MS analysis at different oligomer loadings (20 and 40 mg) and elution with an imidazol step gradient 0-3 mM for ACL6B-IDA and 0-4 mM for ACL6B-CM-Asp.

COS	Purity %			
	IDA (20 mg)	IDA (40 mg)	CM-Asp (20 mg)	CM-Asp (40 mg)
F Dimers	97	99	98	80
F Trimers	76	64	98	83
F Tetramers	53	82	88	70

COS	Yields %			
	IDA (20 mg)	IDA (40 mg)	CM-Asp (20 mg)	CM-Asp (40 mg)
F Dimers	100	85	99	98
F Trimers	68	87	87	75
F Tetramers	62	62	97	60

CHAPITRE V

Discussion, conclusion, et perspectives

Discussion et conclusion

Le système *IMAC* montre un intérêt industriel. De plus, il présente une certaine versatilité quant aux types de supports utilisés (billes, granules, membranes, gels). En effet, plusieurs supports de type IMAC sont commercialement disponibles mais souvent à des coûts élevés. Les synthèses de supports polyhydroxyliques (ACL6B & silice granulaire) réalisées au laboratoire, ont montré une homogénéité des matériaux à un moindre coût de production.

Les travaux du projet de maîtrise ont permis de développer trois phases stationnaires chélatantes: les fonctions IDA (iminodiacétate), CM-Asp (carboxyméthyl-Aspartate) et TED (Tris carboxyméthylethylenediamine) ont été greffées sur des billes d'agarose CL6-B d'une taille moyenne de 100 μm . Des supports de silice (particules de 5-25 μm et 9-11 μm) ont été fonctionnalisés avec des groupements de type IDA.

La caractérisation par FT-IR des phases stationnaires chélatantes obtenues démontre la formation de groupements fonctionnels confirmée par des changements vibrationnels. Dans le cas des billes d'agarose, des pics attribuables aux CH_2 aliphatiques ont été observés à 2900-2800 cm^{-1} et d'autres correspondant aux elongations C-N et C-O-C à 1170 cm^{-1} et 1040 cm^{-1} . Les bandes d'absorption entre 1650-1550 cm^{-1} (C=O) et des pics à 1400 cm^{-1} ($-\text{COO}^-$) et 1740 cm^{-1} ($-\text{COOH}$) confirment la dérivatisation avec des groupements chélatants. Les dérivés de silice-IDA montrent également des changements vibrationnels. Ainsi les bandes d'absorption entre 2900-2800 cm^{-1} correspondent aux chaînes aliphatiques de l'agent couplant silane (GLYMO), le pic à 1400 cm^{-1} montre les groupements carboxylates et

les bandes à $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, $1750\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ et $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ sont caractéristiques à $\nu(\text{OH})$, $\nu(\text{C=O})$ et $\nu(\text{Si-O})$. La capacité de rétention en cuivre (II) déterminée par spectroscopie d'adsorption atomique (AAS) des matrices est comparable à celle retrouvée pour les matrices commerciales. Des capacités de rétention comprises entre 20 et 40 $\mu\text{mol Cu}^{2+}/\text{mL}$ de lit de gel pour les dérivés d'agarose et de 150 à 200 $\mu\text{mol de Cu}^{2+} / \text{cm}^3$ pour les dérivés de silice ont été obtenues. Ces différences d'un ordre de grandeur de 10 sont explicables par la surface spécifique de silice.

Les COS (II, III, IV) ont montré une bonne affinité pour l'ensemble des dérivés *IMAC*. Des quantités de rétention comprise entre 2 et 8 mg (COS) / mL de gel ACL6B modifié (IDA>CM-Asp>TED) et de 40 à 200 mg (COS) / g de silice modifiée (IDA) de pH 7 à 9. La séparation du mélange de COS (II, III, IV) a été obtenue sur ACL6B-IDA et ALC6B-CM-Asp. La détection des COS a été effectuée en deux étapes. Tout d'abord lors de la séparation, deux techniques qualitatives ont été employée : la chromatographie sur couche mince corrélée avec des dosages en microplaque à l'acide bicinchoninique (kit BCA, annexe I). L'analyse des fractions obtenues en spectrométrie de masse a montré une séparation partielle avec ACL6B-IDA avec un gradient discontinu d'imidazole (0-3 mM) et une séparation complète sur ACL6B-CM-Asp en utilisant un gradient discontinu de 0-4 mM à un chargement optimal de 20 mg du mélange COS pour 12 mL de lit de gel. Ceci démontre une bonne rétention et un fort potentiel pour l'utilisation de ces phases stationnaires en mode préparatif. À notre connaissance, les travaux ci-présentés, sont les premiers qui ont permis la séparation et l'obtention des COS individuels.

Récemment, les travaux au doctorat de *Aider et al., 2007* et de *Ling Teng Shee et al., (2006-2007)* (groupe *L.Bazinet U.Laval*), ont permis la mise au point d'un système électrodialytique avec membrane d'ultrafiltration. L'effet du pH du milieu et du temps de traitement sur le taux d'électromigration des oligomères de chitosane et

la possibilité de les séparer ont été étudiés. Ce système a permis la séparation du mélange d'oligomère (II, III, IV) de chitosane avec l'obtention du tétramère et de mélanges de di- et trimères et dans d'autres conditions, par augmentation du pH, la séparation du dimère suivi d'un mélange de tri- et tétramères (*Aider et al., 2007*). Il serait donc intéressant de coupler notre concept *IMAC* à ce système électrodialytique afin d'augmenter le potentiel d'applications à grande échelle pour la séparation de COS.

Perspectives

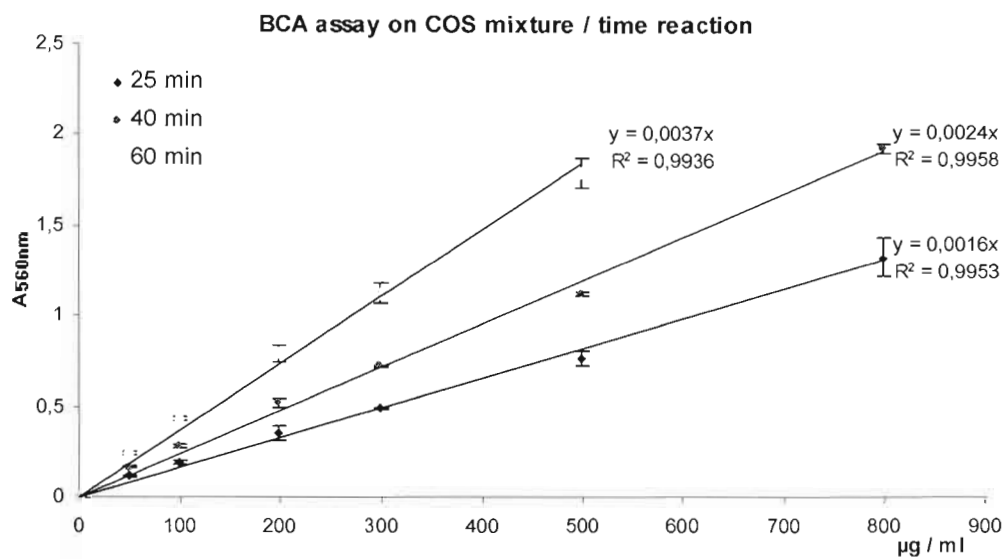
Ce concept de séparation par *IMAC* pourrait être amélioré et appliqué à des systèmes d'ultrafiltration sous forme de membranes ou de disques fonctionnalisés (groupement chélatants), afin de permettre le pré-fractionnement à large échelle de chitosane de différents poids moléculaires ou des COS à un plus haut DP.

Les interactions retrouvées dans le système *IMAC* pourraient permettre le développement de dérivés de COS fonctionnalisés avec des groupements chélateurs. Ceux-ci pourraient être appliqués dans la vectorisation d'ADN (complexé avec le cuivre (II) et les COS) pour vaccination, pour le passage de cuivre (II) complexé dans des cellules afin de pallier les déficits liés aux maladies de *Menkes et de Wilson* (disfonction de certaines ATPases transporteuses de Cu^{2+} intracellulaire) ou encore être greffés sur des biomatériaux pour permettre la croissance voir même la différenciation cellulaire. En effet, chaque type cellulaire demande des milieux plus ou moins spécifiques. Par leur grande biocompatibilité, les COS modifiés pourraient, dépendamment de leur structure, favoriser le développement cellulaire. Les applications potentielles de nos recherches sont prometteuses et laissent entrevoir diverses stratégies d'études futures.

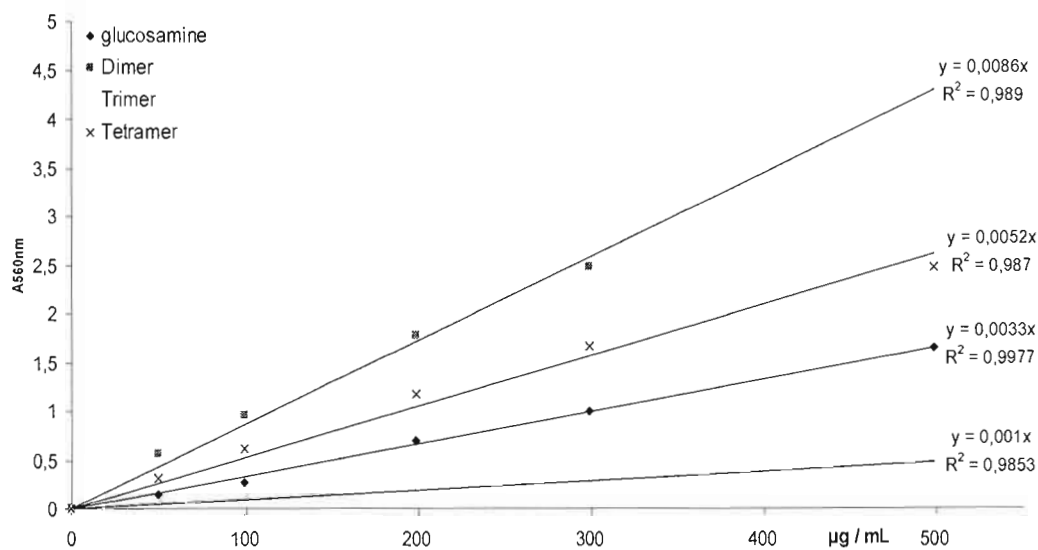
ANNEXES

Annexe I Réactivité des COS avec le Kit BCA (Pierce)

A) Réactivité du mélange de COS (II, III, IV) avec le kit BCA en fonction du temps de réaction à 80 °C (n=3)



B) Réactivité individuelle de la glucosamine et des COS (III, III, IV) avec le kit BCA pendant 30 min. à 80 °C (n=2)



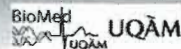
Annexe II Présentation orale BioMed, UQÀM, mai 2007.

Séparation des oligomères du chitosane par chromatographie d'affinité avec ions métalliques immobilisés.

Frantz Le Dévédec¹, Laurent Bazinet², Serge Brunet³, Mircea Alexandre Mateescu¹, département de chimie et centre BioMed, UQÀM¹, Montréal, (Québec), Canada, département des sciences des aliments et nutrition, Université LAVAL², Québec, (Québec), Canada, ISM Biopolymer³, Granby, (Québec) Canada.

Les caractéristiques physico-chimiques du chitosane montrent de grands potentiels dans le domaine biopharmaceutique. Récemment, les oligomères du chitosane suscitent également un intérêt croissant pour certaines applications biomédicales et alimentaires. Suite à une hydrolyse chimique ou enzymatique du chitosane, il est possible d'obtenir différents ratios d'oligomères (COS) d'un degré de polymérisation (DP) allant de 1 à 8. Il est néanmoins difficile d'étudier leurs effets de façon individuelle tant physique que biochimique car ces derniers sont difficile à séparer et encore peu commercialisés. Nous proposons une méthode chromatographique basée sur l'affinité entre les ions métalliques cuivre (II) et les groupements amines des oligomères de chitosane. Des matériaux polyhydroxyliques, (Agarose CL-6B et silice) ont été modifiés avec différentes fonctions chélatantes, soit un greffage d'acide iminodiacétique (IDA), d'acide aspartique carboxyméthylé (CM-Asp) ou de tris(carboxyméthyl)éthylènediamine (TED). Ces matrices ont été caractérisés (FTIR, AAS) puis utilisées en HPLC (séparation COS) et les fractions sont analysées en spectrophotométrie de masse. La capacité de rétention en oligomère de chitosane est respectivement de 6 mg/cm³, 4 mg/cm³ et 2 mg/cm³ de matrice modifiée (ACL6B-IDA, ACL6B-CM-Asp, ACL6B-TED). Les oligomères de chitosane d'un DP inférieur à 4 ont été partiellement séparés et/ou enrichis (selon la méthode employée) à 95 % pour le dimère, 70 % pour le trimère et 90 % pour le tétramère. Cette méthode peut amener à une diminution des coûts de production lors de la préparation de ces oligomères.

Separation of chitosan oligomers (COS) by immobilized metal affinity chromatography



Frantz Le Dévéder¹, Laurent Racine², Alexandra Furtos³, Karine Venne³, Serge Brunet⁴, Mircea Alexandru Mateescu¹

¹Département de Chimie et Centre BioMed, Université de Québec à Montréal, CP 8888, succursale centre ville Montréal (Québec), H3C 3P5, Canada;
²Institut des neurosciences et des aliments fonctionnels (INAF), département des sciences des aliments et nutrition, Université Laval, Québec (Québec), Canada;
³Département de chimie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada;
⁴ISM Biopolymer, Granby (Québec) Canada

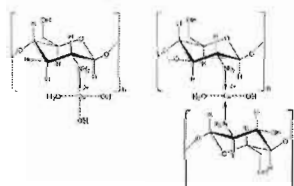


Abstract

IMAC on the differences in the interactions of chelated copper (II) ions with various COS (dimers, trimers, tetramers) is described. Agarose CL-6B was functionalized with various chelating functions such as Imidazole/acetate (IDA), Carboxymethyl-Aspartate (CM-Asp) and Tris(carboxymethyl)ethylendiamine (TED). The COS retention capacities were between 2 and 6 mg/cm², depending on chelating group. The COS were separated and/or enriched up to 95% for dimer and trimer and 90% for the tetramer, with yields of 60 to 95%.

Introduction

Chitosan oligomers (COS)[1] were found to exert several antibacterial activities and to act onto cell pathways, biological macromolecules and metal ions ($\text{Cu}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$) [2].



Scheme 1: Hypothetical structures complexes between Cu^{2+} / COS

The techniques currently applied to produce COS give mixtures of oligomers. Several prior studies described separation of COS by gel permeation or ultrafiltration according to their molecular weight and DP but methods need rather expensive materials and equipment.

Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) [3] based on the interaction between metal ions and the histidine or cysteine on the surface of proteins to be separated.

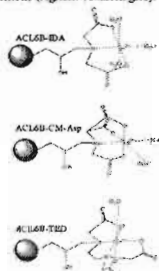
This study describes a chromatographic method based on IMAC developed for the separation and purification COS (I, III, IV). The IMAC chelating matrices have been obtained by derivatization of hydroxyl groups with iminodiacetic acid (IDA), carboxymethyl aspartic acid (CM-Asp) and with tris-(carboxymethyl) ethylenediamine (TED) on agarose beads.

Experimental

Chelating chromatographic materials Sepharose CL-6B (ACLB) was derivatized according Parodi et al [3] for ACLB-IDA and ACLB-TED and for ACLB-CM-Asp according Nelson et al [4]. Materials were characterized by FTIR and AAS.

Conditions Chelating ACLB derivatives were packed into FPLC columns coupled with HPLC pump. Applied sodium acetate 50 mM, 0.3M NaCl pH 4.5, CuSO_4 (250 mM) and a low buffering solution of sodium acetate 50 mM, 0.3M NaCl pH 7.5. After COS loading, step gradient 2-4 mM imidazole was applied.

Detection of oligomers TLC analysis (ninhydrin 0.1%) and BCA assay were used to follow oligomers. Determination of COS population into fractions were performed on an 1100 LC-ESI-MSD SL single quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies).



Scheme 2: Hypothetical structures of chelates in complex with usually used metal ions: IDA- Cu^{2+} , CM-Asp- Cu^{2+} and TED- Cu^{2+} . Spaces to the ACLB are made with epichlorohydrin (EPI).

Results and discussion

FT-IR analysis was first performed to evaluate the chelating capacities on our home-made matrices. Peaks at 2900-2800 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} and 1040 cm^{-1} can be attributed to CH_2 , to C-N and C-O-C stretching. Absorption bands between 1650-1550 cm^{-1} (ascribed to C=O), at 1400 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) and at 1740 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) confirmed derivatization.

ACLB-IDA and ACLB-CM-Asp have shown the highest copper retention (37 and 28 μmol (Cu^{2+}) / mL). ACLB-TED and the commercial Profinity-IDA showed 20 and 24 μmol (Cu^{2+}) / mL.

COS binding capacity (Sch. 1) was found for ACLB-IDA up to 6 mg COS / cm² followed by ACLB-CM-Asp with 5 mg COS / cm² at physiological pH or higher (Fig. 1).

Depend to COS applied (20 and 40 mg), it was possible to purify each COS up to 80% at high loading (Tab. 1). No imidazole and copper were found in FPLC fractions analyzed by HPLC-MS.

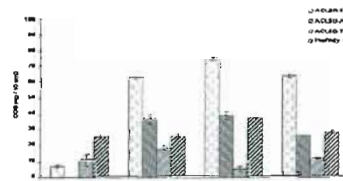
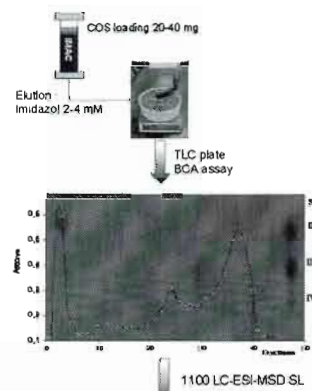


Figure 1: Relative retention capacity of COS on 10 mL of various chelating gels (ACLB-IDA, ACLB-CM-Asp and ACLB-TED). The matrices were loaded with 100 mg of oligomers in 50 mM Acetic acid containing 0.3 M NaCl at different pH and unretained COS were quantified by ninhydrin assay at 570 nm.

ACLB-IDA with 2-3 mM imidazole gradient did not generate a sharp separation. Dimer showed no affinity with chelating gel and was found in the void volume up to 95% in each experiment with 20 and 40 mg of COS loading.

At 20 mg of COS loading, elution with 2-4 mM imidazole gradient given (dimer being eluted into void volume) selectively (45% of I, 15, trimers and tetramers were separated on ACLB-CM-Asp under 2-4 mM imidazole gradient with yields up to 95% and COS purity of 90%.

Conclusion

It was shown an attractive IMAC procedure for small COS separation and purification with low cost material such agarose ACLB beads functionalized with chelating groups. Interesting yields and purification up to 90% were obtained with COS high loading of the column.

Future works

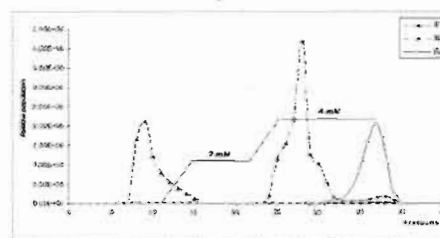
Improved separation at a low size of agarose beads and applied jointly with other procedures (ultrafiltration or electrodialysis) show attractive approach.

Acknowledgements

Thanks are due to FQRNT (Quebec Government) for supporting this project.

References

- [1] Boucher et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 38 (1992) 188
- [2] Rhazi et al., Polymer 43 (2002) 1267
- [3] Parodi et al., Biochemistry 22 (1983) 1621
- [4] Nelson et al., CLONTECH Laboratories, Inc. US (1999)



Step procedure for COS separation. Chromatographic profiles of COS (dimer, trimer, tetramer) on ACLB-IDA using a 2-4 mM imidazole gradient (2-4 mM) at 1 mL/min, detection with BCA reagent for and analyzed with TLC pattern (Ninhydrin-pyridine). HPLC data by LC-ESI-MS system give COS population of each IMAC sample fraction.

Table 1: COS purity and yield of pooled fractions obtained by MS analysis at different oligomers loading (20 and 40 mg) and elution with an imidazole gradient (2-4 mM) for ACLB-IDA and 2-4 mM for ACLB-CM-Asp

COS	Yields %			
	IDA (20 mg)	IDA (40 mg)	CM-Asp (20 mg)	CM-Asp (40 mg)
I Dimers	100	85	99	98
II Trimers	68	87	87	75
III Tetramers	62	82	97	60
COS	Purity %			
	IDA (20 mg)	IDA (40 mg)	CM-Asp (20 mg)	CM-Asp (40 mg)
I Dimers	97	89	95	95
II Trimers	78	84	88	83
III Tetramers	53	81	81	76

BIBLIOGRAPHIE

- Aiba, S.-I., 1991. "Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans". *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, 40-44.
- Aider, M., 2007. "Étude de la mobilité électrophorétique des oligomères de chitosane et leur fractionnement par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (EDUF)". *Thèse de doctorat*, Québec, Université de Laval à Québec, 188 pages.
- Aider, M., J. Arul, et al. 2006. "Electromigration of Chitosan, D-Glucosamine and Oligomers in Dilute Aqueous Solutions." *Journal of agriculture and food chemistry*, 54: 6352-6357.
- Akgol, S. and A. Denizli 2004. "Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in catalase adsorption." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 28(1): 7-14.
- Alves, J.L., Mendonça-Lima, F. W., Alves, C. R., 2004. "The use of metal chelate affinity chromatography on the isolation of *Leishmania chagasi* promastigote hydrophobic proteinases". *Veterinary Parasitology* 119, 137-145.
- Anderson, C., G.; McRea, James, C. 1995. Selective sorbent removal system using polycation activated substrates. United States, Research Medical, Inc. *US. 5416198*.
- Andersson, L., 1991. "Recognition of phosphate groups by immobilized aluminium (III) ions". *Journal of Chromatography A*, 539, 327-334.
- Andersson, L., Porath, J., 1986. "Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe^{3+}) affinity chromatography". *Analytical Biochemistry*, 154, 250-254.
- Anspach, B.F., 1994. "Silica-based metal chelate affinity sorbents I. Preparation and characterization of iminodiacetic acid affinity sorbents prepared via different immobilization techniques". *Journal of Chromatography A*, 672, 35-49.
- Anspach, F.B., 1994. "Silica-based metal chelate affinity sorbents II. Adsorption and elution behaviour of proteins on iminodiacetic acid affinity sorbents prepared via different immobilization techniques". *Journal of Chromatography A*, 676, 249-266.

- Arguelles-Monal, W., Cabrera, G., Peniche, C., Rinaudo, M., 2000. "Conductimetric study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and polygalacturonic acid". *Polymer*, 41, 2373-2378.
- Armisen, P., Mateo C., et al. 1999. "Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate supports." *Journal of Chromatography A* 848(1-2): 61-70.
- Arnold, F.H., 1991. "Metal-affinity separations: A new dimension in protein processing". *BioTechnology*, 9, 151-156.
- Ayers, J.S.B., Geoffrey S. Hancock, William S.; Hearn, Milton T. W., 1982. "Activated matrix and method of activation", New Zealand (Wellington, NZ). Patent 4224439
- Babak, V., Kildeyeva, N., Merkovich, E., 2001. "The production of chitosan-surfactant complex gel capsules for enzyme delivery". *Proceedings of the 28th International Symposium on controlled release of bioactive materials and 4th consumer & diversified products conference*, San Diego, CA, pp. 940-941.
- Babak, V., Lukina, I., Vikhoreva, G., Desbrieres, J., Rinaudo, M., 1999. "Interfacial properties of dynamic association between chitin derivatives and surfactants". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 147, 139-148.
- Bacon, A., Makin, J., Sizer, P.J., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Illum, L., Chatfield, S., Roberts, M., 2000. "Carbohydrate Biopolymers Enhance Antibody Responses to Mucosally Delivered Vaccine Antigens". *Infection and Immunity*, 68, 5764-5770.
- Balau, L., Lisa, G., Popa, M., Tura, V., Melnig, V., 2004. "Physico-chemical properties of Chitosan films". *Central European Journal of Chemistry*, 2, 638-647.
- Barreteau, H., Delattre C., Michaud, P., 2006. "Production of Oligosaccharide as promising New Food Additive generarion". *Food Technology and Biotechnology*, 44, 323-333.
- Boucher, I., Dupuy, A., Vidal, P., Neugebauer, W.A., Brzezinski, R., 1992. "Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 2, 188-193.

- Botros, H.G., Birkenmeier, G., Otto, A., Kopperschlager, G., Vijayalakshmi, M.A., 1991. "Immobilized metal ion affinity partitioning of cells in aqueous two-phase systems: erythrocytes as a model". *Biochimica et Biophysica Acta* 1074, 69-73.
- Braier, N.C., Jishi, R.A., 2000. "Density functional studies of Cu^{2+} and Ni^{2+} binding chitosane". *Journal of Molecular. Structure (Theochem)* 499, 51.
- Brine, C.J., Sandford, Paul. A., Zikakis, John. P., 1992. *Advances in Chitin and Chitosan Elsevier Applied Science* 685.
- Brzezinski, R., Le Houx, JG., Kelly, A. 2004 "Clinical studies on the innocuousness of chitosan and its short-chain derivative generated by enzymatic hydrolysis." *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*.13 : 96.
- Camperi, S.A., Grasselli, M., Cascone, O., 2000. « High-speed pectic enzyme fractionation by immobilised metal ion affinity membranes". *Bioseparation*, 9, 173-177.
- Cardenas, G., Miranda, S. Patricia., 2004. "FTIR and TGA studies of chitosan composite films". *Journal of the Chilean Chemical Society*, 49, 292-295.
- Carunchio, V., Girelli, A., Messina, A., Sinibaldi, M., 1987. « Chitosan-coated silica gel as a new support in high-performance liquid chromatography". *Chromatographia*, 23, 731-735.
- Casey, J.L., Keep, P.A., Chester, K.A., Robson, L., Hawkins, R.E., Begent, R.H.J., 1995. "Purification of bacterially expressed single chain Fv antibodies for clinical applications using metal chelate chromatography". *Journal of Immunological Methods*, 179, 105-116.
- Chaga, G., Hopp, J., Nelson, P., 1999. "Immobilized metal ion affinity chromatography on Co^{2+} -carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle". *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 19-24.
- Chaga, G.S., 2001. "Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 313-334.

- Chen, R.H., Chen, J.S., 2000. "Changes of polydispersity and limiting molecular weight of ultrasound-treated chitosane". *Advance in Chitin Science* 4, 361-366.
- Choi, B.-K., Kim, K.-Y., Yoo, Y.-J., Oh, S.-J., Choi, J.-H., Kim, C.-Y., 2001. In vitro antimicrobial activity of a chitoooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, 553-557.
- Christl, H.K., Kögel-Knabner, I., Kretzschmar, R., 2000. "Chemical heterogeneity of humic substances: characterization of size fractions obtained by hollow-fibre ultrafiltration". *European Journal of Soil Science* 51, 617-625.
- Crawford, J., Ramakrishnan, S., Periera, P., Gardner, S., Coleman, M., Beitle, R., 1999. "Immobilized Metal Affinity Membrane Separation: Characteristics of Two Materials of Differing Preparation Chemistries". *Separation Science and Technology*, 34, 2793 - 2802.
- Czermak, P., Ebrahimi, M., Grau, K., Netz, S., Sawatzki, G., Pfromm, P.H., 2004. "Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process". *Journal of Membrane Science*, 232, 85-91.
- Desbrières, J., Rinaudo, M., Babak, V., Vikhoreva, G., 1997. "Surface activity of water soluble amphiphilic chitin derivatives". *Polymer Bulletin*, 39, 209-215.
- Domard, A., 1987. "pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to Cu (II)-polymer interactions". *International Journal of Biological Macromolecules*, 9, 98-104.
- Domard, A., Rinaudo, M., Terrassin, C., 1986. "New method for the quaternization of chitosane". *International Journal of Biological Macromolecules*, 8, 105-107.
- Domszy, J.G., Roberts, George A. F., 1985. "Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosane". *Die Makromolekulare Chemie*, 186, 1671-1677.
- Feldman, P., Bradbury, P.I., Williams, J.D., Sims, G.E., McPhee, J.W., Pinnell, M.A., Harris, L., Crombie, G.I., Evans, D.R., 1994. "Large-scale preparation and biochemical characterization of a new high purity factor IX concentrate prepared by metal chelate affinity chromatography". *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 5, 939-948.

- Feng, J., Zhao, L., Yu, Q., 2004. "Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, 414-420.
- Figuerola, A., Corradini, C., Feibush, B., Karger, B.L., 1986. "High-performance immobilized-metal affinity chromatography of proteins of iminodiacetic acid silica-based bonded phases". *Journal of Chromatography A*, 371, 335-352.
- Frehaut, G., 2002. « Un procédé "propre" de production du chitosane. Bulletin Électronique (BE) Allemagne ».
- Fwu-Long Mi, H.-W. S., Shin-Shing Shyu, (2002). "Drug release from Chitosan-Alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent" " *Carbohydrate Polymers* 48: 61-72.
- Gama Sosa, M.A., Fazely, F., Koch, J.A., Vercellotti, S.V., Ruprecht, R.M., 1991. "N-carboxymethylchitosan-N,O-sulfate as an anti-HIV-1 agent". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 174, 489-496.
- Goycoolea, F., Arguelles-Monal, W., Peniche, C., Higuera-Ciapara, I., 2000. "Chitin and chitosan. Novel macromolecules in food systems". in: G. Doxastakis and V. Kiosseoglou Ed. *Developments in food science Elsevier*, Amsterdam, 41, pp. 265-308.
- Hari, P.R., Chandy, Thomas., Sharma Chandra. P., 1996. "Chitosan/calcium-alginate beads for oral delivery of insulin". *Journal of Applied Polymer Science*, 59, 1795-1801.
- Helferich, F., 1961. "Ligand Exchange: a Novel Separation Technique". *Nature*, 189, 1001-1002.
- Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrieres, J., Versali, M.F., Rinaudo, M., 2000. "Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan". *Biomacromolecules*, 1, 746-751.
- Hirano, S., Hayashi, K.-i., Hirochi, K., 1992. "Some N-acyl derivatives of O-carboxymethylchitosan". *Carbohydrate Research*, 225, 175-178.
- Hochuli, E., Dobeli, H., Schacher, A., 1987. "New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues". *Journal of Chromatography A*, 411, 177-184.

- Holme, K.R., Perlin, A.S., 1997. "Chitosan N-sulfate. A water-soluble polyelectrolyte". *Carbohydrate Research*, 302, 7-12.
- Hong, S.P., Kim, M.H., Oh, S.W., Han, C.H., Kim, Y.H., 1998. "ACE inhibitory and antihypertensive effect of chitosan oligosaccharides in SHR". *Korean Journal of Food Science and Technology* 30, 1476-1579.
- Hosokawa, J., Nishiyama, M., Yoshihara, K., Kubo, T., 1990. „Biodegradable film derived from chitosan and homogenized cellulose". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 29, 800-805.
- Huguet, M.L., Groboillot, A., Neufeld R. J., Poncelet D., Dellacherie, E., 1994. "Hemoglobin encapsulation in chitosan/calcium alginate beads". *Journal of Applied Polymer Science*, 51, 1427-1432.
- Hwang, J.K., 2001. "Production of functional carbohydrates by the extrusion reactor". *Food sciences and biotechnology*, 10, 455-459.
- Ichikawa, S., Takano, K., Kuroiwa, T., Hiruta, O., Sato, S., Mukataka, S., 2002. "Immobilization and stabilization of chitosanase by multipoint attachment to agar gel support". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93, 201-206.
- Ikeda, I., Sugano, M., Yoshida, K., Sasaki, E., Iwamoto, Y., Hatano, K., 1993. "Effects of chitosan hydrolyzates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentration in rats". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 431-435.
- Il'ina, A.V., Varlamov, V.P., 2004. "Hydrolysis of Chitosan in Lactic Acid". *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 300-303.
- Izume, M. Ohtakara, A., 1987. "Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan". *Agricultural and Biological Chemistry* 51, 1189-1191.
- Jameela, S.R., Misra, A., Jayakrishnan, A., 1994. "Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs". *Journal of biomaterials science*. Polymer edition, 6, 621-632.
- Jeon, Y.J., Kim, S.K., 2000. "Continuous production of chitoooligosaccharides using a dual reactor system". *Process Biochemistry*, 35, 623-632.

- Jeon, Y.J., Kim, S.K., 2002. "Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in ultrafiltration membrane reactor system". *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 503-507.
- Jeon, Y.-J., Kim, S.-K., 2000. "Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity". *Carbohydrate Polymers*, 41, 133-141.
- Jeon, Y.-J., Park, P.-J., Kim, S.-K., 2001. "Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor". *Carbohydrate Polymers*, 44, 71-76.
- Jeong, H.-J., Koo, H.-N., Oh, E.-Y., Chae, H.-J., Kim, H.-R., Suh, S.-B., Kim, C.-H., Cho, K.-H., Park, B.-R., Park, S.-T., Lee, Y.-M., Kim, H.-M., 2000. "Nitric oxide production by high molecular weight water-soluble chitosan via nuclear factor-[kappa]B activation". *International Journal of Immunopharmacology*, 22, 923-933.
- Jeuniaux, C., Voss-Foucart Marie Françoise., and Bussers Jean Claude., 1993. « La production de chitine par les crustacés dans les écosystèmes marins ». *Aquatic Living Ressources*, 6, 331-341.
- Jinno, K., Takayama, Katsumi., 1989. "Separation of saccharides on cross linked chitosan beads with microcolumn liquid chromatography". *Journal of Microcolumn Separations*, 1, 195-199.
- Johnson, E.L., Peniston, Q.P., 1982. "Utilization of Shellfish Waste for Chitin, Chitosan" in: R.E. Martin, Flick, G.J., Hebard, C.E., Ward D.R., (Ed.) *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*, AVI Publishing Co, Westport, CT, USA.
- Kasaai, M.R., 2007. "Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data". *Carbohydrate Polymers*, 68, 477-488.
- Kaslow, D.C., Shiloach, J., 1994. "Production, purification and immunogenicity of a malaria transmission- blocking vaccine candidate: TBV25H expressed in yeast and purified using nickel-NTA agarose". *Nature Bio/Technology*, 12, 494-499.
- Khan, T.A., Peh, K.K., Ch'ng, H.S., 2002. "Reporting degree of deacetylation values of chitosan: The influence of analytical methods". *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 205-212.

- Kim, J.Y., Lee, J.K., Lee, T.S., Park, W.H., 2003. "Synthesis of chitoooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*". *International Journal of Biological Macromolecules*, 32, 23-27.
- Kim, S.-K., Rajapakse, N., 2005. "Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review". *Carbohydrate Polymers*, 62, 357-368.
- Kim, S.Y., Shon, D.H., Lee, K.H., 1998. "Purification and characteristics of two types of chitosanases from *Aspergillus fumigatus* KH-94". *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 568-574.
- Ko, M.J., Jo, W.H., Kim, H.C., Lee, S.C., 1997. "Miscibility of chitosans/polyamide 6 blends". *Polymer Journal*, 29, 997-1001.
- Kobelke, D.N., 1990. "Products from Crustacean Wastes. Chitin production. Technology Development". *Journal of Food Technology*, 5, 114-121.
- Kochkina, Z.M., Chirkov, S.N., 2000. "Effect of chitosan derivatives on the reproduction of coliphages T2 and T7". *Mikrobiologiya*, 69, 257-260.
- Kohn, J., Wilchek, M., 1982. "Mechanism of activation of Sepharose and Sephadex by cyanogen bromide". *Enzyme and Microbial Technology*, 4, 161-163.
- Koping-Hoggard, M.T., I.; Guan, H.; Edwards, K.; Nilsson, M.; Varum, K. M.; Artursson, P., 2001. "Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo". *Gene Therapy*, 8, 1108-1121.
- Koping-Hoggard, M.V., K.M., Issa M., Danielsen, S., Christensen, B E., Stokke, B.T., Artursson, P., 2004. "Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers". *Gene Therapy*, 11, 1441-1452.
- Kopperschlager, G., H.-J. Böhme, et al. (1982). Cibacron blue F3G-A and related dyes as ligands in affinity chromatography. *Chromatography*: 101-138.
- Kuroiwa, T., Ichikawa, S., Hiruta, O., Sato S., Mukataka, S., 2002. „Factors Affecting the composition of oligosaccharides produced in chitosan hydrolysis using immobilized chitosanases". *Biotechnology Progress*, 18, 969-974.

- Kuznetsov, P. V. 1993. "Epoxy-activated adsorbents in liquid chromatography of physiologically active substances (review)." *Pharmaceutical Chemistry Journal* 27(6): 439-452.
- Laboureau, E., Capiod, J.C., Dessaint, C., Prin, L., Vijayalakshmi, M.A., 1996. "Study of human cord blood lymphocytes by immobilized metal ion affinity partitioning". *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 680, 189-195.
- Le Dung, P., Milas, M., Rinaudo, M., Desbrieres, J., 1994. "Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosane". *Carbohydrate Polymers*, 24, 209-214.
- Le Tien, Canh., 2004. « Polymères biocompatibles pour l'immobilisation d'agents bioactifs avec applications biomédicales et bioalimentaires. » *Thèse de doctorat*, Montréal, *Université du Québec à Montréal*, 222 pages.
- Le Tien, C., Lacroix, M., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.-A., 2003. "N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release". *Journal of Controlled Release*, 93, 1-13.
- Liang, T.-W., Chen, Y.-J., Yen, Y.-H., Wang, S.-L., 2007. "The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656". *Process Biochemistry*, 42, 527-534.
- Lin Teng Shee, F., M. Araya-Farias, J. Arul, Mateescu, A. M. Brunet, S. Bazinet, L. 2006. "Chitosan solubilization by bipolar membrane electro-acidification." *Desalination* 200 : 623.
- Lin Teng Shee, F., J. Arul, A. M. Brunet, S. Bazinet, L. 2007. "Chitosan solubilization by bipolar membrane electroacidification: Reduction of membrane fouling." *Journal of Membrane Science* 290 : 29-35.
- Liu, Q., Lin, J., Liu, M., Tao, X., Wei, D., Ma, X., Yang, S., 2007 "Large scale preparation of recombinant human parathyroid hormone 1-84 from *Escherichia coli*". *Protein Expression and Purification*., 54, 212-219.
- Liu, W., Sun, S.J., Zhang, X., De Yao, K., 2003. "Self-aggregation behavior of alkylated chitosan and its effect on the release of a hydrophobic drug". *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 14, 851-859.

- Liu, W.G., Zhang, X., Sun, S.J., Sun, G.J., Yao, K.D., Liang, D.C., Guo, G., Zhang, J.Y., 2003. "N-Alkylated Chitosan as a Potential Nonviral Vector for Gene Transfection". *Bioconjugate Chemistry*, 14, 782-789.
- Maezake, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., 1993. „Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57, 1439-1444.
- Magaud, D., Grandjean, C., Doutheau, A., Anker, D., V. Shevchik, Cotte-Pattat, N., Robert-Baudouy, J. , 1997. "An efficient and highly stereoselective alfa(1-4) glycosylation between two D-galacturonic acid ester derivatives". *Tetrahedron Letter*, 38, 241-244.
- March, S. C., I. Parikh, et al. 1974. "A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography." *Analytical Biochemistry* 60(1): 149-152.
- Martin, L., Wilson, C.G., Koosha, F., Tetley, L., Gray, A.I., Senel, S., Uchegbu, I.F., 2002. "The release of model macromolecules may be controlled by the hydrophobicity of palmitoyl glycol chitosan hydrogels". *Journal of Controlled Release*, 80, 87-100.
- Mathur, N.K., Narang, C.K., 1990. "Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals". *Journal of Chemical Education*, 67, 938-942.
- Matsuo, K., Miyazono, I., 1993. "The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout". Nippon Suisan Gakkaishi, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 59 599, 1377-1379.
- Mi, F.-L., Sung, Hsing-Wen., Shyu, Shin-Shing., 2002. "Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent". *Carbohydrate Polymers*, 48, 61-72.
- Mi, F.L., Her, N.L., Kuan, C.Y., Wong, T.B., Shyu, S.S. 1997." Chitosan tablets for controlled release of theophylline: effect of polymer-drug wet or dry blending and anionic-cationic interpolymer complex". *Journal of Applied Polymer Science*, 66, 2495-2505.
- Min, C., Verdine, G.L., 1996. "Immobilized metal affinity chromatography of DNA". *Nucleic Acids Research*, 24, 3806-3810.

- Mitani, T., Fukumuro, N., Yoshimoto, C., Ishii, H., 1991. "Effect of counter ions (SO_4^{2-} and Cl^-) on the adsorption of copper and nickel ions by swollen chitosan beads". *Agricultural Biological Chemistry*, 55, 2419.
- Mitsutomi, M., Isono, M., Uchiyama, A., Nikaidou, N., Ikegami, T., Watanabe, T., 1998. "Chitosanase activity of the enzyme previously reported as beta-1,3-1,4-glucanase from *Bacillus circulans* WL-12". *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62, 2107-2114.
- Moore, G.K., Roberts, G.A.F., 1980. "Determination of the degree of N-acetylation of chitosane". *International Journal of Biological Macromolecules*, 2, 115-116.
- Mucha, M., Piekilna, J., Wieczorek, A., 1999. "Characterisation and morphology of biodegradable chitosan / synthetic polymer blends". *Macromolecular Symposia*, 144, 391-412.
- Muraki, E., Aiba, S., 1996. *Proceedings from the second Asia Pacific chitin symposium*, Bangkok, Thailand. 283-285.
- Muraki, E., Yaku, F., Kojima, H., 1993. "Preparation and crystallization of glucosamine oligosaccharides with dp 6-8". *Carbohydrate Research*, 239, 227-237.
- Muszynska, G., Andersson, L., Porath, J., 1986. "Selective adsorption of phosphoproteins on gel-immobilized ferric chelate". *Biochemistry*, 25, 6850-6853.
- Muszynska, G., Dobrowolska, G., Medin, A., Ekman, P., Porath, J.O., 1992. "Model studies on iron(III) ion affinity chromatography. II. Interaction of immobilized iron(III) ions with phosphorylated amino acids, peptides and proteins". *Journal of Chromatography*, 604, 19-28.
- Muzzarelli, R.A.A., 1973. "Natural chelating polymers: alginic acid, chitin and chitosane". Pergamon Press, Oxford. 254
- Muzzarelli, R.A.A., Xia, W., Tomasetti, M., Ilari, P., 1995. "Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of a wheat germ lipase preparation". *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 541-545.
- Muzzarelli, R.A.A., 1996. "Chitosan-based dietary foods". *Carbohydrate Polymers*, 29, 309-316.

- Muzzarelli, R.A.A., Peter, M.G., 1997. "The Chitin Handbook". in: Grottoammare (Ed.) Atec, Italy, pp. 528.
- Muzzarelli, R.A.A., Tomasetti, M., Ilari, P., 1994. "Depolymerization of chitosan with the aid of papain". *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 110-114.
- NC-IUBMB, 2007. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (Enzymatic nomenclature).
- Naeem, A., Khan, R. H., Saleemuddin, M., 2006. "Single step immobilized metal ion affinity precipitation/chromatography based procedures for purification of concanavalin A and Cajanus cajan mannose-specific lectin". *Biochemistry*, 71, 56-59.
- Naggi, A.M., Torri, G., Compagnoni, T., Casu, B., 1986. "Synthesis and physico-chemical properties of a polyampholyte chitosan 6-sulfate". in: C.J.a.G.W.G. R.A.A. Muzzarelli, Editors (Ed.) *Chitin in nature and technology*. Plenum Publishing Corporation,, New York 371-377.
- Ndassa, Y. M., C. Orsi, et al. 2006. "Improved Immobilized Metal Affinity Chromatography for Large-Scale Phosphoproteomics Applications." *Journal of Proteome Research*. 5 : 2789-2799.
- Nelson, P.S., Yang, Te-Tuan., Kain, Steven R., 1999. "Method for purification of recombinant proteins". CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), United States.
- Nilsson, K., Mosbach, K., 1980 . "p-Toluenesulfonyl chloride as an activating agent of agarose for the preparation of immobilized affinity ligands and proteins." *European Journal of Biochemistry* 112 : 397-402.
- No, H.K., Cho, Y.I., Kim, H.R., Meyers, S.P., 2000. "Effective Deacetylation of Chitin under Conditions of 15 psi/121°C". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2625-2627.
- Noa, H.K., Park, N.Y., Lee. S.H., 2002. "Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights". *International Journal of Food Microbiology*, 75, 65 -72.
- Nwe, N., Stevens, W.F., 2002. "Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction". *Biotechnology Letters*, 24, 131-134.

- Okamoto, Y., Inoue, Aika., Miyatake, Katsuyuki., Ogihara, Kikumi., Shigemasa, Yoshihiro., Minami, Saburo., 2003. "Effects of Chitin/Chitosan and Their Oligomers/Monomers on Migrations of Macrophages". *Macromolecular Bioscience*, 3, 587-590.
- Okamoto, Y., Kawakami, K., Miyatake, K., Morimoto, M., Shigemasa, Y., Minami, S., 2002. "Analgesic effects of chitin and chitosane". *Carbohydrate Polymers*, 49, 249-252.
- Park, P.J., Je, J.Y., Kim, S.K., 2003. "Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity of Hetero-Chitoooligosaccharides Prepared from Partially Different Deacetylated Chitosans". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4930-4934.
- Park, P.-J., Je, J.-Y., Jung, W.-K., Ahn, C.-B., Kim, S.-K., 2004. Anticoagulant activity of heterochitosans and their oligosaccharide sulfates. *European Food Research and Technology*, 219, 529-533.
- Patwardhan, A.V., Goud, G.N., Koepsel, R.R., Ataai, M.M., 1997. "Selection of optimum affinity tags from a phage-displayed peptide library. Application to immobilized copper (II) affinity chromatography". *Journal of Chromatography A*, 787, 91-100.
- Patwardhan, A.V., Goud, G.N., Pasquinelli, R.S., Koepsel, R.R., Ataai, M.M., 1998. "Phage-Displayed Libraries for the Selection of Optimal Affinity Peptides for Protein Purification Using Ni-Nitrilotriacetic Acid". *Biotechnology Techniques*, 12, 421-424.
- Paunovic, I., Schulin, R., Nowack, B., 2005. "Evaluation of immobilized metal-ion affinity chromatography for the fractionation of natural Cu complexing ligands". *Journal of Chromatography A*, 1100, 176-184.
- Pearson, R.G., 1973. "Hard and soft acids and bases". in: R.G. Pearson (Ed.). *Hutchington & Ross, Stroudsburg, PA*, pp. 53-59, 67-85.
- Peniche, C., Argüelles-Monal, Waldo., 2001. "Chitosan based polyelectrolyte complexes". *Macromolecular Symposia*, 168, 103-116.
- Peniche-Covas, C., Alvarez, L.W., Argüelles Monal, W., 1992. « The adsorption of mercuric ions by chitosane". *Journal of Applied Polymer Science*, 46, 1147-1150.

- Piazza, G.J., Medina, M.B., 1997. "Covalent immobilization of enzymes using available CDI-activated agarose". in: G.F. Bickerstaff (Ed.) *Immobilization of enzyme and cells*. Humana Press, New-Jersey, 299-308.
- Pixley, R.A., Colman, R.W., 1986. "Purification of human factor XII from plasma using zinc chelate affinity chromatography". *Thrombosis Research*, 41, 89-98.
- Porath J, Axen R, Ernback S. Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature*. 1967 Sep 30 1491–1492.
- Porath, J., Carlsson, J.A.N., Olsson, I., Belfrage, G., 1975. "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation". *Nature*, 258, 598-599.
- Porath, J., Olin, B., Granstrand, B., 1983. "Immobilized-metal affinity chromatography of serum proteins on gel-immobilized group III A metal ions". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 225, 543-547.
- Pospieszny, H., Chirkov, S., Atabekov, J., 1991. „Induction of antiviral resistance in plants by chitosane". *Plant Science*, 79, 63-68.
- Poulis, J. A., C. H. Massen, et al. 2007. "Saving time when measuring BET isotherms." *Journal of Colloid and Interface Science* 311(2): 391-393.
- Qin, C., Du, Y., Xiao, L., Li, Z., Gao, X., 2002. « Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity". *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 111-117.
- Raymond, L., Morin, F.G., Marchessault, R.H., 1993. "Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR". *Carbohydrate Research*, 246, 331-336.
- Remunan-Lopez, C., Portero, A., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1998. "Design and evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery". *Journal of Controlled Release*, 55, 143-152.
- Ren, D., Penner, N.A., Slentz, B.E., Inerowicz, H.D., Rybalko, M., Regnier, F.E., 2004. "Contributions of commercial sorbents to the selectivity in immobilized metal affinity chromatography with Cu(II)". *Journal of Chromatography, 27th International Symposium on High-Performance Liquid-Phase Separations and Related Techniques. Part II*, 1031, 87-92.

- Rhazi, M., Desbrières, J., Tolaimate, A., Rinaudo, M., Vottero, P., Alagui, A., , 2002. "Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomers". *Polymer*, 43, 1267-1276.
- Rhazi, M., Desbrieres, J., Tolaimate, A., Rinaudo, M., Vottero, P., Alagui, A., El Meray, M., 2002. "Influence of the nature of the metal ions on the complexation with chitosan.: Application to the treatment of liquid waste". *European Polymer Journal*, 38, 1523-1530.
- Rinaudo, M., le Dung P., Milas, M., 1992. "A new and simple method of synthesis of carboxymethylchitosans". C.J. Brine, P.A. Sandford and J.P. Zikakis (Ed.) *Advances in chitin and chitosan*. Elsevier, London and New York pp. 516-525.
- Rinaudo, M., 2006. "Chitin and chitosan: Properties and applications". *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- Rinaudo, M., Pavlov, G., Desbrieres, J., 1999. "Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosane". *Polymer*, 40, 7029-7032.
- Roberts, G.A.F., Domszy, J.G., 1982. "Determination of the viscometric constants for chitosane". *International Journal of Biological Macromolecules*, 4, 374-377.
- Rouessac, F., Rouessac A., 2000. « Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes ». 5ième Ed. Dunod, 55-113.
- Saito, H., Tabeta, R., Ogawa, K., 1987. "High-resolution solid-state carbon-13 NMR study of chitosan and its salts with acids: conformational characterization of polymorphs and helical structures as viewed from the conformation-dependent carbon-13 chemical shifts". *Macromolecules*, 20, 2424-2430.
- Samain, E., Drouillard, S., Heyraud, A., Driguez, H., Geremia, R.A., 1997. "Gram-scale synthesis of recombinant chitoooligosaccharides in *Escherichia coli*". *Carbohydrate Research*, 302, 35-42.
- Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G., 2005. "Maximization of fructooligosaccharide production by two stage continuous process and its scale up". *Journal of Food Engineering*, 68, 57-64.
- Sashiwa, H., Saimoto, H., Shigemasa, Y., Ogawa, R., Tokura, S., 1991. "Lysozyme susceptibility of partially deacetylated chitins". *International Journal of Biological Macromolecules*, 12, 295.

- Schiell, J.E., Mallik, R., Soman, S., Joseph, K.S., Hage, D.S., 2006. "Applications of silica supports in affinity chromatography". *Journal of Separation Science*, 29, 719-737.
- Serpa, G., A. E. F. Pires., Tamashiro, W.M. S.C., Ribeiro, M. B., Miranda E. A., and Bueno, S. M.A., 2005. "Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G1 monoclonal antibody". *Journal of Chromatography B*, 816(1-2): 259-268.
- Shahgholi, J.H.C., B.J. Rappoli, D.A. Rowley, 1997. "Investigation of Copper-Saccharide Complexation Reactions using Potentiometry and Electrospray Mass Spectrometry". *Journal of Mass Spectrometry*, 32, 1080.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.-J., 1999. "Food applications of chitin and chitosans". *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37-51.
- Shiro Kobayashi, H.U., 2003. "Biomacromolecules and Bio-Related Macromolecules". *Macromolecular Chemistry and Physics*, 204, 235-256.
- Shirui, M., Shuai, X., Unger, F., Simon, M., Bi, D., Kissel, T., 2004. "The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties". *International Journal of Pharmaceutics*, 281, 45-54.
- Singh, D.K., Ray, A.R., 2000. "Biomedical Applications of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives". *Polymer Reviews*, 40, 69 - 83.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman T.A., 2003. "Principes d'analyses instrumentale". 5^{ème} Ed. De boeck diffusion, Bruxelles 725-766.
- Smith, T.H., LaTour, J.V., Bochkariov, D., Chaga, G., Nelson, P.S., 1999. "Bifunctional Phosphoramidite Reagents for the Introduction of Histidyl and Dihistidyl Residues into Oligonucleotides". *Bioconjugate Chemistry*, 10, 647-652.
- Strand, S.P., Danielsen, S., Christensen, B.E., Varum, K.M., 2005. "Influence of Chitosan Structure on the Formation and Stability of DNA-Chitosan Polyelectrolyte Complexes". *Biomacromolecules*, 6, 3357-3366.
- Sudharshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D., 1992. "Antibacterial action of chitosan". *Food Biotechnology* 6, 257-272.
- Sugano, M., Yoshida, K., Hashimoto, M., Enomoto, K., Hirano, S., 1992. "Hypocholesterolemic activity of partially hydrolyzed chitosans in rats". in:

Advance in chitin and chitosan (Ed.) Brine, C., Zikakis J.P., Sandford, P. Elsevier, London, UK

Sugano, M., Watanabe, S., Kishi, A., Izume, M., Ohtakara, A., 1988. "Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats". *Lipids*, 23, 187-191.

Sulkowski, E., Vastola, K., Oleszek, D., von Muenchhausen, W. , 1982. "Surface topography of interferons: a probe by metal chelate chromatography." *ACS symposium. Series. 9*, 313-322.

Sulkowski, E., 1989. "The saga of IMAC and MIT". *BioEssays*, 10, 170-175.

Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S., Suzuki, M., 1986. „Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose". *Carbohydrate Research*, 151, 403-408.

Takacs, B.J., Girard, M.F., 1991. "Preparation of clinical grade proteins produced by recombinant DNA technologies". *Journal of Immunological Methods*, 143, 231-240.

Takeo, K., Ohguchi, Y., Hasegawa, R., Kitamura, S., 1995. "Synthesis of (1,4)-beta-D-xylo-oligosaccharides of dp 4-10 by a blockwise approach". *Carbohydrate Research*, 278, 301-313.

Terbojevich, M., Cosani, A., Muzzarelli, R.A.A., 1996. „Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain". *Carbohydrate Polymers*, 29, 63-68.

Tokoro, A.T., N : Suzuki, K : Mikami, T : Suzuki, S : Suzuki, M 1988. "Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor". *Chemical and pharmaceutical bulletin* 36, 784-790.

Tommerraas, K.V., K.M.; Christensen, B.E.; Smidsrod, O., 2001. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans *Carbohydrate Research*, 333, 137-144.

Ueno, K., Yamaguchi, T., Sakairi, N., Nishi, N. and Tokura, S., 1997. "Antimicrobial activity by fractionated chitosan oligomers". A. Domard (Ed.) *Advances in chitin science*. Jacques Andre Publisher, Lyon.

Varum, K.M., Antohonsen, M.W., Grasdalen, H., Smidsrod, O., 1991. "Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl

- groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy". *Carbohydrate Research*, 211, 17-23.
- Vasiliu, S., Popa, M., Rinaudo, M., 2005. "Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers". *European Polymer Journal*, 41, 923-932.
- Vishu Kumar, A.B., Varadaraj, Mandyam. C., Gowda, Lalitha. R., Tharanathan, Rudrapatnam. N., 2005. "Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*". *The Biochemical Journal* 391, 167-175.
- Wilchek, M., Oka, Takami., Topper, Yale J., 1975. "Structure of a Soluble Super-Active Insulin is Revealed by the Nature of the Complex between Cyanogen-Bromide-Activated Sepharose and Amines " *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 1055-1058.
- Yalpani, M., 1985. "A survey of recent advances in selective chemical and enzymatic polysaccharide modifications". *Tetrahedron*, 15, 2957-3020.
- Yalpani, M., Pantaleone, D., 1994. "An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis". *Carbohydrate Research* 256, 159-175.
- Yamasaki, Y., Fukumoto, I., Kumagai, N., Ohta, Y., Nakagawa, T., Kawamukai, M., Matsuda, H., 1992. "Continuous chitosan hydrolyzate production by immobilized chitosanolytic enzyme from *Enterobacter sp.* G-1". *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56, 1546-1551.
- Yilmaz, S., Widersten, M., Emahazion, T., Mannervik, B., 1995. "Generation of a Ni(II) binding site by introduction of a histidine cluster in the structure of human glutathione transferase A1-1". *Protein Engineering*, 8, 1163-1169.
- Yip, T.-T., Nakagawa, Y., Porath, J., 1989. "Evaluation of the interaction of peptides with Cu(II), Ni(II), and Zn(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography". *Analytical Biochemistry*, 183, 159-171.
- Yokoi, H., Aratake, T., Nishio, S., Hirose, J., Hayashi, S., Takasaki, Y., 1998. "Chitosan Production from Shochu Distillery Wastewater by Funguses". *Journal of fermentation and bioengineering*, 85, 246-249.
- Zhang, M., Tan, T., Yuan, H., Rui, C., 2003. "Insecticidal and Fungicidal Activities of Chitosan and Oligo-chitosan". *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 18, 391-400.